



# UNIVERSITÀ DI PISA

Facoltà di Agraria

Corso di Laurea Specialistica in  
Biotecnologie Vegetali e Microbiche

Tesi di Laurea

## ANALISI BIDIMENSIONALE DI PROTEINE INDOTTE E REPRESSE DA SHOCK TERMICO IN *MEDICAGO SATIVA*

Relatore:  
Dott. Lorenzo Guglielminetti

Candidato:  
Dionisio Caputo

Correlatore:  
Dott.ssa Lucia Guidi

Tutor aziendale:  
Dott. Stephan Summerer

---

ANNO ACCADEMICO 2005-2006

## *Ringraziamenti*

*Vorrei ringraziare Il Dott.Francesco Cellini, la Dott.ssa Rina Iannacone ,il Dott.Lorenzo Guglielminetti(Università di Pisa) e la Dott.ssa Lucia Guidi (Università di Pisa) che mi hanno dato la possibilità di fare questa formativa esperienza, nel centro di ricerca Metapontum Agrobios s.r.l.*

*In particolare il Dott.Stephan Summerer che con la sua esperienza professionale e la sua preparazione mi ha trasmesso preziose nozioni.*

*Un sentito e doveroso ringraziamento alla Dott.ssa Lucia Semeraro e al Dott. Donato Melfi che con la loro pazienza mi hanno aiutato a portare a termine il lavoro di tesi. Inoltre ringrazio tutti i tecnici in particolare il sig Giuseppe Festa, Il sig.Mario Melidoro e il sig Rocco Novario che mi hanno fatto sentire a mio agio in un ambiente amichevole.*

<b>1 Introduzione</b>	<b>6</b>
1.1 Erba Medica ( <i>Medicago sativa</i> L.)	6
1.1.1 Importanza economica e diffusione	6
1.1.2 Caratteri botanici e biologia	6
1.1.3 La risposta agli stress abiotici	9
1.2 Le Heat Shock Protein	10
1.2.1 HSP 100/clp	15
1.2.2 HSP 90	15
1.2.3 HSP 60	16
1.2.4 HSP 70	17
1.2.5 SHSPs	20
1.3 Proteomica	19
1.3.1 Definizione	21
1.3.2 Tecnologie proteomiche	22
1.3.3 Spettrometria <i>Maldi-ToF</i>	24
1.4 Obiettivo del progetto di tesi	25
<b>2 Materiali e metodi</b>	<b>28</b>
2.1 Materiale vegetale e campionamento	28
2.2 Induzione dello shock termico	28
2.3 Estrazione delle proteine	29
2.4 Determinazione della concentrazione proteica con il metodo <i>Bradford</i>	32
2.5 Preparazione dei gel di poliacrilammide (PAA)	33
2.6 Analisi bidimensionale	34
2.6.1 La prima dimensione: isoelettrofocalizzazione	34
2.6.2 Equilibratura dei gel strip	38
2.6.3 La seconda dimensione: SDS-PAGE	39
2.7 Colorazione con Blue Silver	40
2.8 Elaborazione informatica dei dati	41
2.9 Identificazione degli spot tramite spettrometria di massa	44
<b>3 Risultati e discussione</b>	<b>46</b>
3.1 Confronto tra i diversi protocolli di estrazione	46
3.1.1 Estrazione con TRIS-NaCl	47
3.1.2 Estrazione con SDS	49
3.1.3 Estrazione con fenolo	50
3.1.4 Estrazione con acetone –TCA	51
3.1.5 Scelta del metodo di estrazione delle proteine	52
3.2 Valutazione dei range di pH per l'IEF	52
3.2.1 Analisi bidimensionale con gel strip pH 3-10	53

3.2.2	Analisi bidimensionale con gel strip pH 3-6	54
3.2.3	Analisi bidimensionale con gel strip pH 5-8	55
3.2.4	Analisi bidimensionale con gel strip pH 4-7	56
3.3	Analisi bidimensionale	58
3.3.1	Grandezza dei gel bidimensionali	58
3.3.2	Importanza delle repliche	60
3.4	Analisi informatiche con PDQuest 2-D analysis Software	62
3.4.1	Risultati per ogni analisi ( <i>Analysis set report</i> )	63
3.4.2	Risultati quantitativi ( <i>Quantity table report</i> ) ed analisi di spettrometria di massa	68
<b>4</b>	<b>Conclusioni e futuri sviluppi</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>Appendice</b>	<b>82</b>

# Capitolo 1

## Introduzione

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Erba Medica (*Medicago sativa* L.)

### 1.1.1 Importanza economica e diffusione

L'erba medica è considerata la pianta foraggera per eccellenza. Nei confronti con altre foraggere da prato le sono infatti riconosciuti notevoli vantaggi circa la produttività, la longevità, la capacità di ricaccio, la facilità di conservazione, il valore nutritivo del foraggio e l'azione miglioratrice sulle proprietà fisiche e chimiche del terreno. Tradizionalmente considerata come coltura da fieno, essa può fornire una certa utilizzazione come pascolo, può essere facilmente insilata e sottoforma di farina disidratata impiegata nell'alimentazione animale come concentrato proteico.

### 1.1.2 Caratteri botanici e biologia

Al genere *Medicago* appartengono moltissime specie tra le quali *M. sativa* è la più importante. Specie tetraploide ( $2n = 32$ ), verosimilmente originatasi per autopoliploidia dal diploide *M. cerulea* ( $2n = 16$ ), è tipica delle regioni temperate. Tra le altre specie appartenenti al genere *Medicago* sono da ricordare, in modo particolare, *M. Falcata* e *M. Media* (= *M. Varia*).

La prima, endemica delle regioni più settentrionali tra il 42° e 62° latitudine Nord, è coltivata nell'Asia nord-orientale ed anche in alcune zone dell'Europa orientale. A *M. media* appartengono, invece, alcuni tipi coltivati piuttosto diffusamente nell'Europa settentrionale e nel nord degli Stati Uniti. Essa deriva dall'ibridazione fra *M. sativa* e *M. falcata*, è caratterizzata da una grandissima variabilità e presenta caratteristiche morfologiche, fisiologiche ed agronomiche

intermedie fra le due specie. In particolare, è dotata di resistenza al freddo molto superiore a quella di *M. sativa* e, per tale motivo, la sua area di coltivazione può estendersi a latitudini più elevate.

L'erba medica è una pianta perenne, provvista di apparato radicale fittonante molto robusto che raggiunge mediamente alcuni metri di profondità. Gli steli sono eretti o suberetti e si originano dalla parte basale della pianta detta corona. Le ramificazioni si dipartono dai nodi immediatamente sovrastanti quelli basali. Le foglie sono alterne, trifogliate con la fogliolina mediana inserita su di un picciolo più lungo di quello delle laterali. Le foglioline, più o meno oblunghie, sono glabre, hanno il margine seghettato in prossimità dell'apice e terminano con un mucrone che è costituito dal prolungamento della nervatura centrale. I fiori, numerosi, sono riuniti in racemi che si dipartono dal fusto in posizione ascellare e presentano una piccola brattea alla base del peduncolo.

Il ciclo biologico, dell'erba medica si articola in varie fasi:

- *Germinazione.* Affinchè avvenga tale processo, che implica un'intensa attività enzimatica, è indispensabile che il seme abbia una sufficiente disponibilità idrica e si trovi in presenza di livelli termici adeguati. Per quanto riguarda la temperatura, l'erba medica, come le altre leguminose foraggere, è da questo punto di vista abbastanza tollerante e in condizioni di campo può germinare entro un intervallo di temperature abbastanza ampio. Si ritiene che le medie giornaliere di 25°C siano da considerarsi ottimali per la rapida crescita delle plantule, mentre al di sotto dei 10°C o al di sopra dei 35°C l'emergenza tende ad annullarsi. Questi limiti termici divengono più estesi in condizioni di laboratorio nelle quali la temperatura ottimale di germinazione è di 20°C, mentre il limite minimo può essere abbassato a 5°C.
- *Sviluppo vegetativo.* Dopo la germinazione, la plantula si presenta con un asse molto esile ed un internodo molto corto tra il punto in cui divergono i cotiledoni ed il nodo su cui è inserita la prima foglia. Poco dopo l'emergenza dei cotiledoni l'ipocotile e la parte superiore della radice iniziano a contrarsi in

lunghezza ed ad espandersi in diametro. Contemporaneamente, all'ascella delle prime foglie, si differenziano delle gemme, talune delle quali si sviluppano in ramificazioni con comportamento rizomatoso caratterizzate da nodi basali molto ravvicinati dai quali si sviluppano gli steli.

L'insieme delle porzioni basali dello stelo principale e di tali ramificazioni costituisce la corona sulla quale già prima della fine della prima stagione si differenziano altre gemme avventizie che si svilupperanno in altrettanti steli alla successiva ripresa vegetativa.

- *Sviluppo radicale.* Parallelamente allo sviluppo e all'accrescimento della porzione epigea della pianta ha luogo lo sviluppo dell'apparato radicale.

La radice principale, che deriva direttamente dalla radichetta embrionale, già alla fine del primo anno può raggiungere, in condizioni favorevoli, i tre metri e più di profondità. La grande profondità alla quale il fittone può giungere conferisce alla pianta di medica, in terreni profondi, una notevole resistenza alla siccità.

- *Sviluppo riproduttivo.* La fase riproduttiva nella medica, ha inizio con la formazione di una protuberanza di tessuto meristematico in prossimità dell'apice vegetativo, dalla quale originano i primordi fiorali che danno luogo all'infiorescenza. L'apice vegetativo, nel contempo, rimane attivo e differenzia nuove foglie e nuovi primordi fiorali mentre lo stelo continua ad allungarsi mettendo in evidenza un tipo di accrescimento chiaramente indeterminato.
- *Accumulo di sostanze di riserva.* Gli organi di riserva della pianta sono la corona e la parte superiore del fittone. Una certa quota di sostanze di riserva è contenuta anche nel resto dell'apparato radicale ma questo, almeno nella pianta adulta, esercita funzioni di assorbimento e di trasporto. Nella medica il materiale di riserva primario è costituito da carboidrati mentre molto poco si conosce circa le funzioni di riserva di composti quali gli aminoacidi o le proteine. (Baldoni *et al.*, 1982)



### 1.1.3 La risposta agli stress abiotici

Le piante sono frequentemente sottoposte a stress, cioè a condizioni esterne che influiscono sfavorevolmente sulla crescita, lo sviluppo o la produttività.

Gli stress possono essere biotici, dovuti ad altri organismi, o abiotici, risultanti da un eccesso o da una carenza dei fattori che determinano le caratteristiche fisiche o chimiche dell'ambiente. Tra le condizioni ambientali che causano danno vi sono l'allagamento, la siccità, le alte o basse temperature, l'eccessiva salinità del suolo, uno squilibrio dei nutrienti minerali del suolo e un'eccessiva o scarsa intensità luminosa. Anche composti fitotossici come l'ozono possono danneggiare i tessuti delle piante.

La resistenza o la sensibilità allo stress dipende dalle specie, dal genotipo e dallo stadio di sviluppo della pianta. Nelle piante gli stress inducono un'ampia gamma di risposte, a partire da modificazioni dell'espressione genica e del metabolismo cellulare a cambiamenti delle velocità di crescita e delle rese dei raccolti.

La durata, l'intensità, e la velocità con cui uno stress colpisce una pianta sono tutti fattori che influenzano la risposta della pianta stessa. La combinazione di diverse condizioni sfavorevoli può provocare una risposta diversa da quella che si ha in seguito a un singolo tipo di stress. Le caratteristiche della pianta, comprese l'identità degli organi e dei tessuti, lo stadio di sviluppo ed il genotipo, influenzano anch'essi la risposta delle piante agli stress. Le piante esposte ad un eccesso di calore mostrano un gruppo caratteristico di risposte cellulari e metaboliche, molte delle quali sono conservate in tutti gli organismi. La risposta tipica allo stress da calore si manifesta con una diminuzione della sintesi delle normali proteine, accompagnata da una più veloce trascrizione e traduzione di un nuovo gruppo di proteine conosciuto come *heat shock protein (HSP)*.

Oltre a modificare i profili di espressione genica, il calore danneggia anche le strutture cellulari, come gli organelli ed il citoscheletro e compromette le funzioni della membrana. Lo shock da calore può insorgere in seguito a varie circostanze, sia legate allo sviluppo sia temporali, con conseguenze che vanno dalla crescita rallentata, al danno dei vari organi, sino alla morte della pianta. In campo lo shock da calore può manifestarsi a livello delle foglie, quando la traspirazione è insufficiente (cioè quando l'acqua è limitante e la temperatura è alta) o quando gli stomi sono parzialmente o totalmente chiusi e l'irradiazione è alta. La durata e l'intensità dello stress, la sensibilità dei diversi tipi di cellule e lo stadio di sviluppo sono tutti fattori che influenzano la capacità di sopravvivenza allo stress da calore di un particolare genotipo.

Le piante possono acquisire termotolleranza se vengono sottoposte per poche ore a temperature alte non letali (permissive) prima di affrontare le condizioni di shock..

Una pianta acclimatata può così sopravvivere all'esposizione a temperature che altrimenti sarebbero letali. Si ritiene che il processo di acclimatazione coinvolga altre proteine, sintetizzate in risposta alle temperature permissive, che conferiscono la termotolleranza all'organismo. Nonostante questa capacità di acclimatarsi, c'è, ovviamente, un limite alla quantità di calore che una pianta può sopportare (Buchanan *et al.*, 2003).

## **1.2 Le Heat Shock Protein (HSP)**

Uno dei primi scienziati ad occuparsi della risposta allo stress è stato Ferruccio Ritossa, che, nel 1962, insieme ai suoi colleghi notò che elevate temperature inducevano particolari modificazioni ed un inusuale profilo di espressione genica in *Drosophila melanogaster* (Ritossa, 1962).

L'identificazione delle proteine coinvolte in questo meccanismo di difesa avvenne però più tardi ed il termine HSP fu coniato solo nel 1974 (Tissieres *et al.*, 1974).

Le HSPs sono una classe di proteine altamente conservate, sia nelle cellule procariotiche, che in quelle eucariotiche.

Negli eucarioti i geni che codificano per queste proteine, definiti geni *heat shock* (HSG), sono stati classificati in due gruppi principali, in base alla natura della loro attivazione trascrizionale.

Nel primo gruppo sono inclusi i geni espressi in risposta allo stress da calore ed il loro nome è relativo al peso molecolare della proteina (*HSP gene*).

Al secondo gruppo appartengono i geni trascritti in maniera costitutiva in condizioni normali e sono definiti geni *heat shock cognate* (*HSC gene*).

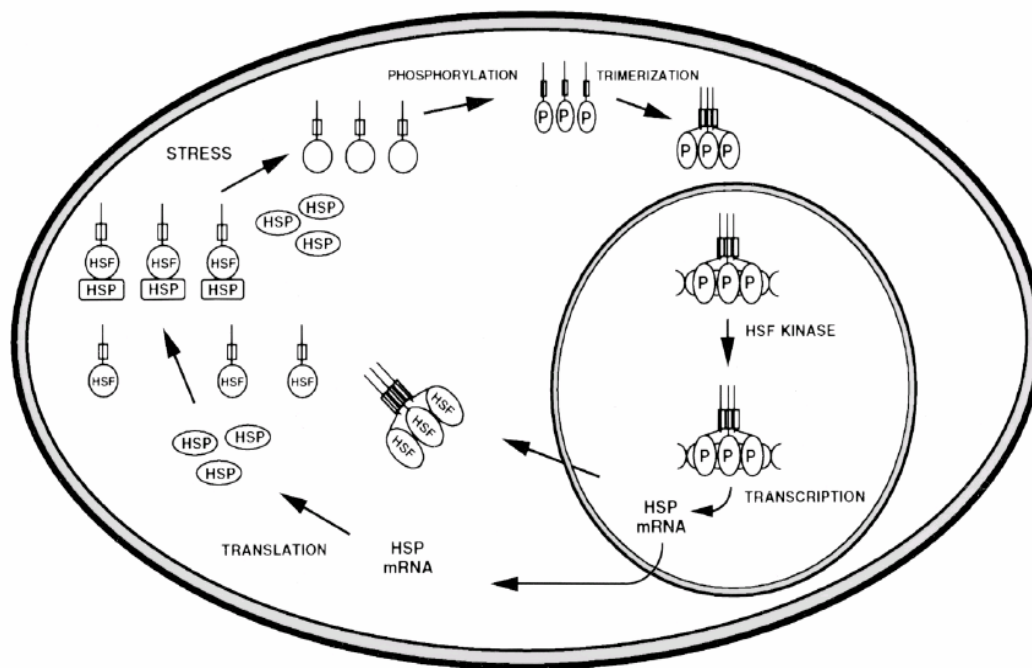
Come per tutti i geni anche per i geni HSP, la trascrizione è regolata dall'interazione tra fattori di trascrizione *heat shock transcription factors* (HSFs) e la sequenza *consensus*, localizzata a monte della regione promotrice definita come *heat shock element* (HSEs). Questa sequenza di riconoscimento a livello del DNA consiste di un *repeat* pentanucleotidico con una sequenza *core* 5'– nGAAn – 3' (*head module*), altamente conservata tra i vari organismi (Pelham, 1982).

Nei vertebrati sono stati identificati quattro HSFs; tra questi l'HSF1 rappresenta l'elemento principale nella risposta a stress fisiologici e ambientali.

In condizioni normali esso è presente a livello citosolico come molecola monomerica incapace di legare il DNA. In condizioni di stress le proteine citosoliche denaturate, o non correttamente ripiegate, attivano l'HSF1 che viene fosforilato, da proteine chinasi (Kim *et al.*, 1997) e convertito in forma trimerica. Il trimero lega il DNA, trasloca nel nucleo dove si lega agli HSE dei geni HSP e ne attiva la trascrizione (Morimoto, 1998) (Figura 1).

Le HSPs fanno parte delle classi più importanti dei chaperoni, ma non tutte le HSP sono chaperoni e non tutti i chaperoni sono indotti da stress da calore (Nicoll *et al.*, 2006). Secondo una recente definizione, per chaperone molecolare si intende una

proteina che in modo temporaneo si lega ad un'altra proteina per stabilizzarne una conformazione instabile, favorendo una serie di eventi: assemblaggio di oligomeri, interazioni con altre componenti cellulari, cambio tra forme attive e inattive, trasporto intracellulare e degradazione proteolitica, autonomamente o con l'aiuto di cofattori (Agashe and Hartl, 2000). Quindi la funzione fondamentale dei chaperoni è di facilitare il



**Figura 1** Meccanismo proposto per descrivere l'incremento stress-indotto delle HSP in cellule umane e di *Drosophila melanogaster*. Gli HSF normalmente localizzati nel citosol sono legati alle HSP e sono inattivi. In condizioni di stress gli HSF si separano dalle HSP, sono fosforilati da proteine chinasi e formano trimeri che traslocano dal citosol al nucleo. Nel nucleo gli HSF legano il DNA a livello degli HSE nella regione promotrice dei geni HSP. Gli HSF sono ulteriormente fosforilati nel nucleo e inducono la trascrizione degli mRNA per le HSP. Gli HSF lasciano, quindi, il nucleo e ritornano nel citosol dove legano le HSP (Kiang, 1998).

ripiegamento di proteine minimizzando le interazioni inter-intramolecolari sbagliate.

I chaperoni sono molecole ubiquitarie in tutte le forme di vita e fino ad ora si conoscono 20 differenti famiglie conservate durante l'evoluzione.

Le HSPs sono state raggruppate in diverse famiglie in relazione al loro peso molecolare. I membri equivalenti alle famiglie di HSPs tra i diversi organismi

presentano un elevato grado di similarità di sequenza e conservano la stessa funzione biologica.

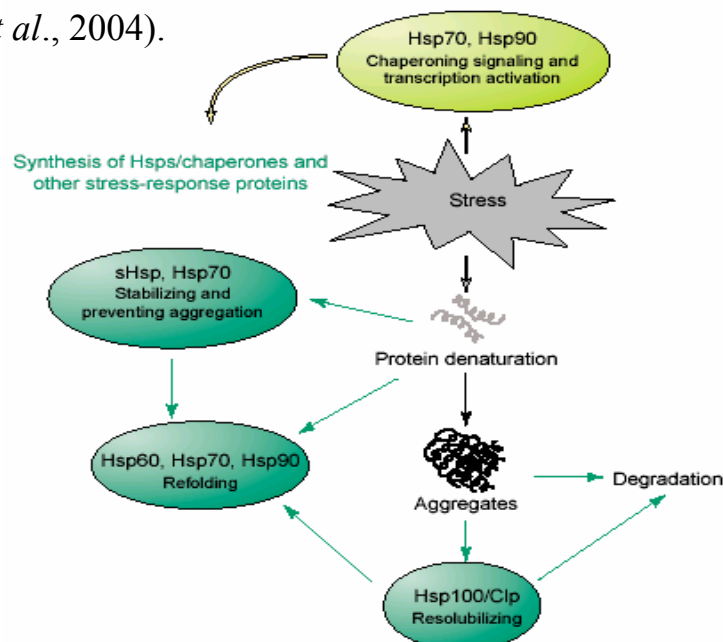
Le principali famiglie di HSPs sono rappresentate dalle HSP100/Clp, HSP90, HSP70, HSP60/chaperonine e una larga famiglia di HSPs a basso peso molecolare (12-40 KDa), definite small HSP (SHSPs) (Wang *et al.*, 2004). In tabella 1 sono riportati i membri rappresentativi di ciascuna famiglia, la loro localizzazione intracellulare e le principali funzioni svolte.

Classes	Representative members	Intracellular localization	Major functions
<b>Hsp70</b>			Preventing aggregation, assisting refolding, protein import and translocation, signal transduction, and transcriptional activation
Subfamily: DnaK	Hsp/Hsc70 Hsp70 Bip <sup>1</sup>	Cytosol Chloroplast, mitochondria Endoplasmic reticulum	
Hsp110/SSE	Hsp91	Cytosol	
<b>Chaperonin/Hsp60</b>			Folding and assisting refolding
Subfamily: Group I Group II	Cpn60 <sup>2</sup> CCT <sup>3</sup>	Chloroplast, mitochondria Cytosol	
<b>Hsp90</b>	Hsp90		Facilitating maturation of signaling molecules, genetic buffering
	AtHsp90-1 AtHsp90-5 AtHsp90-6 AtHsp90-7	Cytosol Chloroplast Mitochondria Endoplasmic reticulum	
<b>Hsp100/Clp</b>	Hsp100 <sup>4</sup>		Disaggregation, unfolding
Subfamily: Class I	ClpB, ClpA/C ClpD	Cytosol, mitochondria	
Class II	ClpM, ClpN ClpX, ClpY	Chloroplast Chloroplast	
<b>sHsp</b>			Preventing aggregation, stabilizing non-native proteins
Subfamily: I	Hsp17.6	Cytosol	
II	Hsp17.9	Cytosol	
III	Hsp21 Hsp26.2 <sup>5</sup>	Chloroplast	
IV	Hsp22	Endoplasmic reticulum	
V	Hsp23 <sup>5</sup>	Mitochondria	
VI	Hsp22.3	Membrane	

**Tabella 1** Membri principali delle famiglie HSP con rispettiva localizzazione cellulare e funzione (Wang *et al.*, 2004).

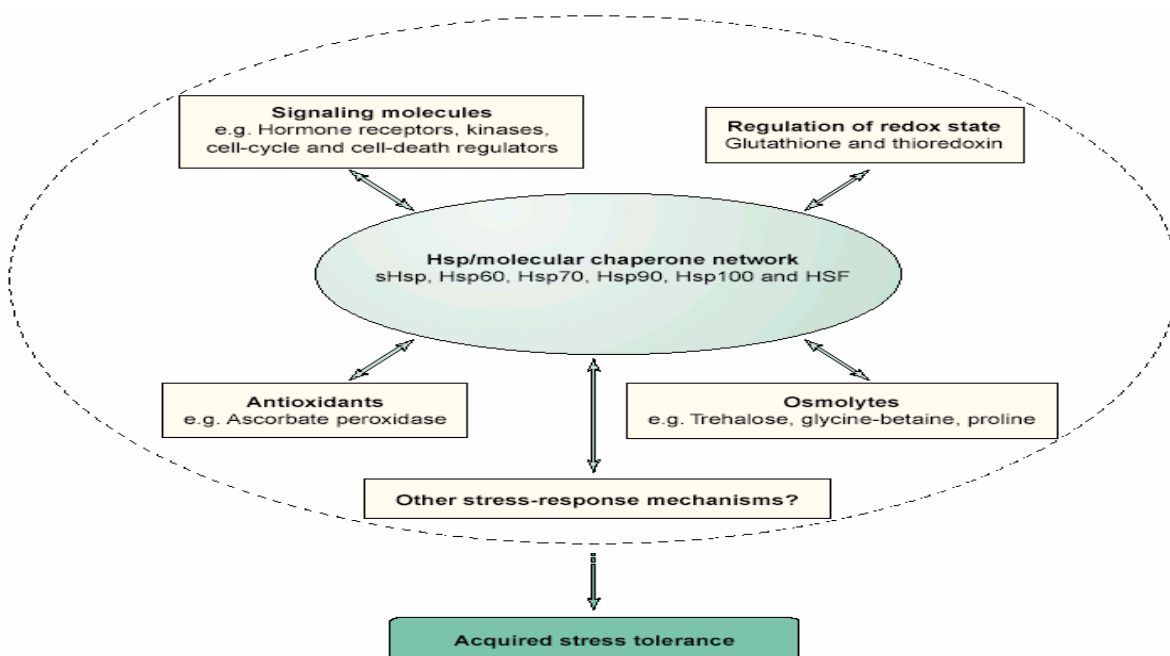
In condizioni di stress le HSPs cooperano tra loro nel mantenimento dell'omeostasi cellulare. In figura 2 è riportato il “sistema network HSP/chaperone “ caratterizzato dalla cooperazione di diverse classi di HSPs nella protezione e nel

ripristino della omeostasi cellulare negli organismi viventi in condizioni di stress abiotico (Wang *et al.*, 2004).



**Figura 2** Meccanismo di cooperazione tra differenti famiglie di HSP/chaperone nel mantenimento dell'omeostasi cellulare in condizioni di stress (Wang *et al.*, 2004).

Il “sistema *network*” descritto in figura 2 sembrerebbe essere collegato ad altri meccanismi di difesa adottati dalle piante nella risposta allo stress (figura 3).



**Figura 3** Interazione tra il sistema HSP/chaperone e altri meccanismi di difesa adottati dalle piante nell'acquisizione della tolleranza allo stress (Wang *et al.*, 2004).

Le HSPs cooperano infatti con un gruppo di composti organici a basso peso molecolare che si accumulano negli organismi in risposta a stress osmotici (Singer and Linqvist, 1998). Ben documentata è anche l'interazione delle HSPs con un crescente numero di molecole segnale, che comprendono recettori degli ormoni nucleari, tirosine e serine/treonine chinasi, regolatori del ciclo cellulare e della morte cellulare, dimostrando il loro ruolo chiave nei sistemi di traduzione dei segnali cellulari (Wang *et al.*, 2004).

### **1.2.1 HSP100/Clp**

I membri di questa famiglia di proteine oltre a funzionare da chaperoni molecolari, impedendo il cattivo ripiegamento delle proteine, giocano un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, impedendo la formazione di aggregati proteici e/o promuovendo la degradazione di proteine non funzionali (Wang *et al.*, 2004; tabella 1).

Nel prevenire l'aggregazione proteica, le HSP100/Clp cooperano con un altro sistema chaperone ATP-dipendente, le HSP70. In particolare, i membri della famiglia HSP100/Clp solubilizzano gli aggregati proteici e rilasciano le proteine che, in seguito all'intervento delle HSP70, assumono la loro giusta conformazione (Goloubinoff *et al.*, 1999). L'espressione delle HSP100, in genere presenti nelle piante in maniera costitutiva, è potenzialmente regolata e indotta da diversi fattori di stress ambientali, come il calore, il freddo, la siccità e l'alta concentrazione salina dei suoli (Queitsch *et al.*, 2000).

### **1.2.2 HSP90**

La famiglia delle HSP90 si distingue dalle altre famiglie di HSPs per la natura dei suoi substrati, coinvolti principalmente nei meccanismi trasduzionali, come il

recettore degli ormoni steroidei e le proteine chinasi (Young *et al.*, 2001). Il loro ruolo principale resta comunque quello di dirigere il ripiegamento delle proteine (Frydman, 2001). Il ruolo più importante delle HSP90 è gestire il piegamento delle proteine (Frydman *et al.*, 2001; Buchner *et al.*, 1999) ma giocano un ruolo importante nel *network* della traduzione del segnale, nel controllo del ciclo cellulare, nel degradare e nel veicolare le proteine (Young *et al.*, 2001; Pratt *et al.*, 2001).

Le HSP90 rappresentano una delle classi di proteine più abbondanti nelle cellule, esse costituiscono, infatti, l'1-2% delle proteine cellulari totali (Frydman 2001).

Dati recenti hanno associato a queste proteine una ulteriore funzione, ossia quella di interagire con il proteosoma 26 S e di giocare un ruolo essenziale nel suo assemblaggio e mantenimento (Imai *et al.*, 2003).

Sebbene le HSP90 siano presenti in maniera costitutiva in molti organismi, come per i membri delle altre famiglie di HSP, la loro espressione incrementa in risposta agli stress sia nei procarioti che negli eucarioti (Krishna *et al.*, 2001).

### **1.2.3 HSP60 (*chaperonine*)**

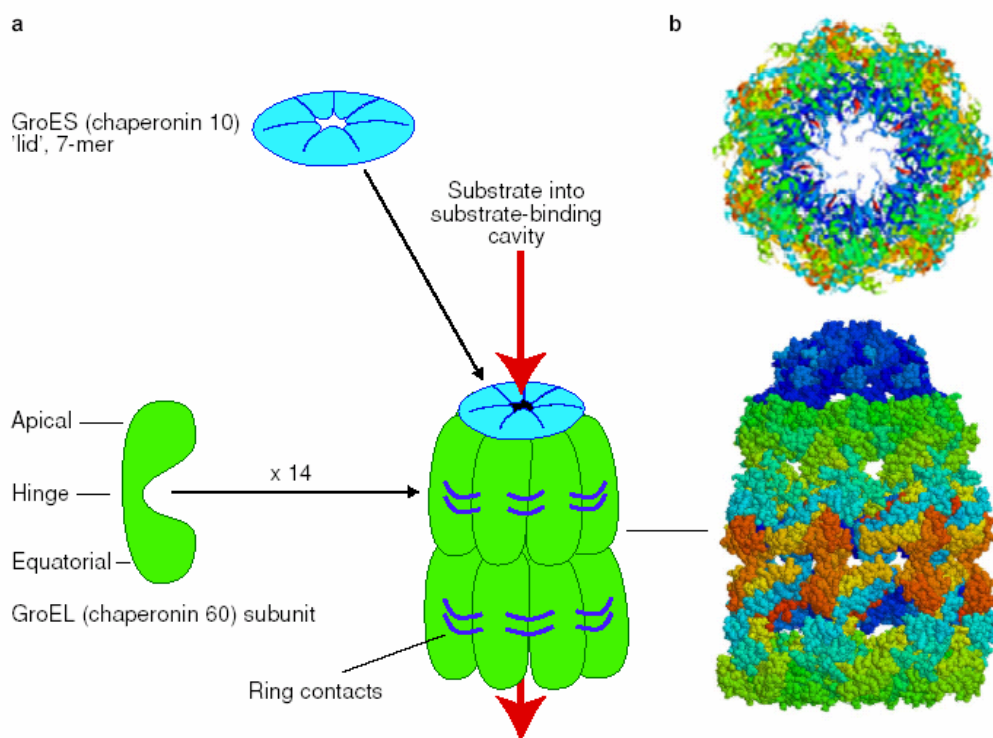
Questa famiglia di proteine, è anche nota con il termine *chaperonine*, suggerito per la prima volta nel 1988 per descrivere una classe di chaperoni molecolari omologhi dal punto di vista evolutivo, alla proteina GroEL di *E.coli* (Hemmingsen *et al.*, 1988).

Le *chaperonine* suddivise in due classi: le *chaperonine* GroEL presenti in batteri, mitocondri e cloroplasti, e le *chaperonine* CCT, trovate negli *Archea* e nel citosol degli eucarioti (Ranson *et al.*, 1998; Tabella 1).

Le *chaperonine* 60 giocano un ruolo importante, assistendo un'ampia gamma di proteine neosintetizzate e neotraslocate, riconducendole alla loro forma nativa (Bukau *et al.*, 1998 ; Frydman, J. 2001).



I membri della famiglia delle *chaperonine* hanno una caratteristica struttura a doppio anello, ciascuno costituito da 14 subunità, che racchiude una cavità centrale all'interno della quale si legano i substrati proteici che devono subire il ripiegamento (Ranford *et al.*, 2000) (figura 4). Ciascuna delle 14 subunità è costituita da tre domini: un dominio apicale, responsabile del legame con altri elementi proteici; un dominio equatoriale, che contiene il sito di legame per l'ATP; e un dominio intermedio che connette i primi due. In *E.coli* GroEL insieme con GroES (*chaperonina* 10) gioca un ruolo critico nel ripiegamento di molte proteine cellulari, sia in condizioni normali che di stress (Ewalt *et al.*, 1997 (figura 4).



**Figura 4** Struttura della chaperonina 60 e della chaperonina 10. In a è mostrato il complesso tra GroEL (chaperonina 60, in verde) e GroES (chaperonina 10, in blu). In b è riportata la struttura della cavità centrale del complesso che lega il substrato, ottenuta mediante l'utilizzo di RasMol dal database proteico file 1AON.pdb (Ranford *et al.*, 2000)

## 1.2.4 HSP70

La famiglia delle HSP70 è tra le famiglie delle HSPs quella più studiata. Oltre che dirigere il ripiegamento delle proteine, le HSP70 sono coinvolte in diverse attività

cellulari, come la degradazione delle proteine, la riorganizzazione di componenti del citoscheletro, l'inizio della traduzione, l'*import* e l'*export* di proteine nucleari, l'assemblaggio dei ribosomi e la sintesi del DNA (Forreiter and Nover, 1994).

I membri della famiglia delle HSP70 sono altamente conservati, mostrando una percentuale di identità tra le cellule eucariotiche compresa tra il 60-78% ed un'identità del 40-60% tra l'HSP70 eucariotica e l'omologa DNA K di *E.coli* (Caplan *et al.*, 1993).

Tutte le HSP70 presentano un dominio di legame per l'ATP (*ATPase-domain*), un sito di legame per il peptide (*peptide binding domain*) e un dominio C-terminale di 10 kDa.

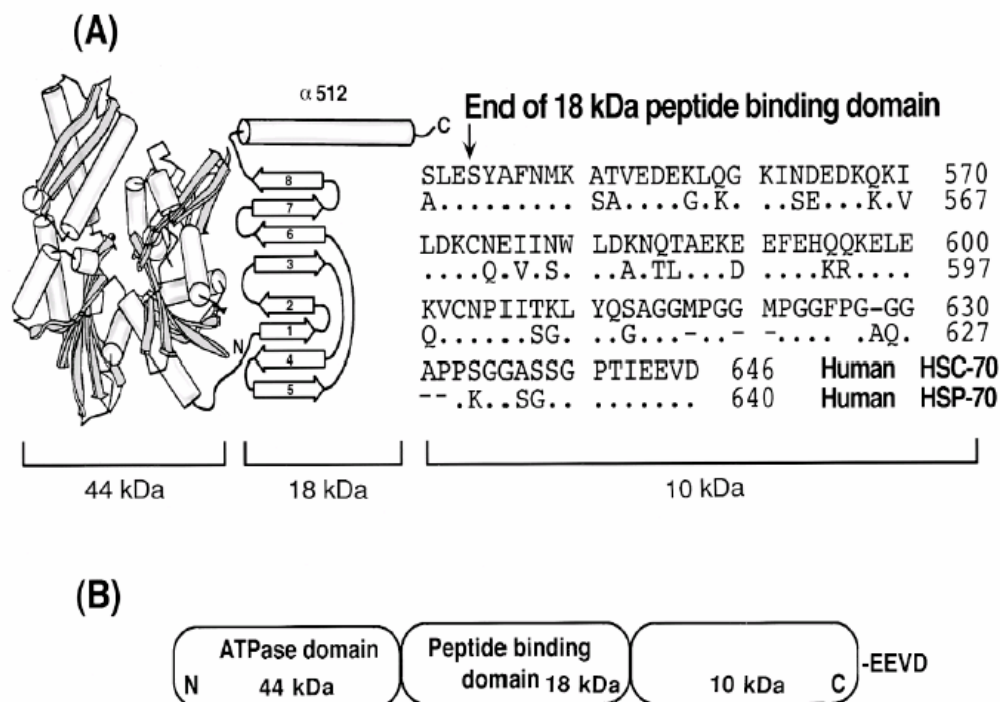
La porzione C-terminale di 10 kDa (aa 542-646) è un' $\alpha$ -elica, seguita da un segmento terminale altamente conservato EEVD (Hightower *et al.*, 1994).

Il dominio di legame per l'ATP è localizzato nel frammento di 44 kDa (aa 1-386) nella porzione N-terminale delle proteine HSP70 e HSC70 (Wang *et al.*, 1993; Morshauser *et al.*, 1995); mentre il *peptide binding domain* è contenuto nel frammento di 18 kDa (aa 384-543). Questo frammento è formato da due porzioni ognuna costituita da 4 foglietti  $\beta$  antiparalleli, e da una porzione ad  $\alpha$ -elica (Wang *et al.*, 1993; Morshauser *et al.*, 1995).

I cicli di legame e rilascio del substrato sono coordinati dall'attività intrinseca della ATPasi, che richiede la partecipazione di co-chaperoni come DnaJ/HSP40 e GrpE (Wang *et al.*, 2004).

In figura 5 è riportata la struttura molecolare e la caratterizzazione dei domini dell'HSP70 e HSC70 umana. Mentre i domini di 44 kDa e 18 kDa dell'HSP70 sono altamente conservati nell'HSC70, il dominio C-terminale di 10 kDa differisce di 26 residui amminoacidici. Tutta la sequenza di HSP70 risulta 6 amminoacidi più corta rispetto a quella dell'HSC70 (Leung and Hightower, 1997) (Figura 5).

Sulla base delle loro proprietà funzionali e strutturali simili a quelle delle HSP70, sono state classificate nella stessa famiglia: HSP110 citosolica dei mammiferi, proteine SSE di lievito e ortologhi di Grp170 dei mammiferi.



**Figura 5** Struttura molecolare dell'HSC70 e HSP70 umana (A) e caratterizzazione dei singoli domini (B) (Kiang and Tsokos, 1998).

I ruoli specifici delle HSP70 dipendono dal posizionamento nei differenti compartimenti subcellulari, dai livelli di espressione a diversi stadi di sviluppo e dall'interazione con diversi gruppi di proteine.

Nel genoma di *Arabidopsis* almeno 18 geni codificano per HSP70, di questi, 14 appartengono alla subfamiglia DnaK e 4 alla subfamiglia HSP110/SSE.

Almeno 12 membri della famiglia HSP70 sono stati trovati nel genoma di spinacio. Analisi dei profili di espressione dei geni HSP70 in spinacio ed *Arabidopsis* dimostrano che i membri dell'HSP70 (chaperoni) sono espressi in risposta a condizioni di stress. Nelle piante, la sovraespressione di questi geni è correlata positivamente con un aumento di tolleranza a stress termici, salini e idrici (Wang *et al.*, 2004).

Le attività dei membri appartenenti alle diverse famiglie di HSP descritte, svolte singolarmente, o in cooperazione con altre HSP, contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi cellulare in condizioni di stress (Figura 2).

### 1.2.5 sHSP<sub>s</sub> (*Small Heat Shock Protein*)

Le sHSPs rappresentano le HSP a più basso peso molecolare (12-40 kDa), alcune espresse durante alcuni stadi di sviluppo ma, generalmente, sintetizzate in risposta a stress da calore e non, sia nelle cellule eucariotiche che in quelle procariotiche.

Le sHSPs condividono un dominio C-terminale di 90 aa, chiamato dominio  $\alpha$ -cristallino (ACD) che è simile al dominio del cristallino degli occhi dei vertebrati. Le sHSPs non sono in grado di ripiegare proteine denaturate ma hanno un'alta capacità di legame con esse e, probabilmente attraverso interazioni idrofobiche, le stabilizzano e prevengono la loro aggregazione facilitando il seguente ripiegamento da parte di chaperoni ATP-dipendenti come il sistema DnaK oppure ClpB/DnaK. (Wang *et al.*, 2004).

Le sHSPs sono presenti in maggior numero nelle piante rispetto ad animali e lieviti e differiscono tra loro in relazione alla localizzazione cellulare ed alle funzioni svolte (Waters *et al.*, 1996).

Nelle piante questa famiglia di proteine è stata suddivisa in base alla similarità amminoacidica ed alla localizzazione cellulare in 6 classi.

Le classi I e II includono le sHSPs citoplasmatiche, la classe III include le sHSPs localizzate nei cloroplasti, la classe IV le sHSPs localizzate a livello del reticolo endoplasmatico, la classe V le sHSPs dei mitocondri e la classe VI quelle intermembrana.

La presenza delle sHSPs in molti compartimenti cellulari riflette probabilmente un adattamento molecolare alle condizioni di stress a cui una pianta può essere sottoposta. L'abbondanza delle sHSPs nelle piante e le loro caratteristiche di legame e di stabilizzazione di proteine denaturate, suggeriscono che queste proteine giocano un ruolo importante nella tolleranza acquisita agli stress (Wang *et al.*, 2004).

## 1.3 Proteomica

### 1.3.1 Definizione

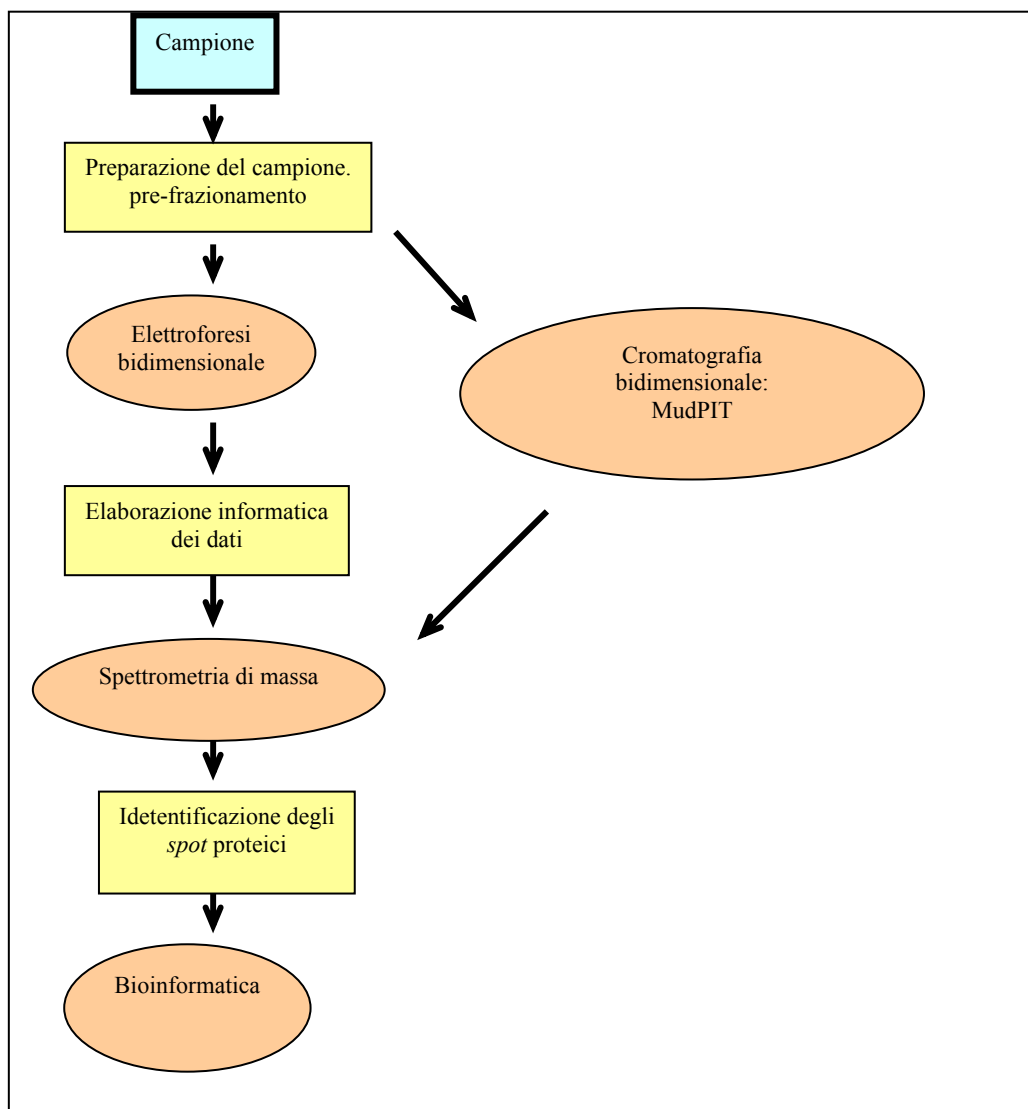
La proteomica è la scienza che si occupa dell'analisi del proteoma, cioè dell'insieme dei prodotti proteici espressi dal genoma (questo termine coniato da Wilkins *et al.* nel 1996, sottende un concetto molto semplice ma di vastissime applicazioni e prospettive). Si tratta infatti di un'entità non fissa come il genoma, che varia con lo stadio di sviluppo, la localizzazione tissutale specifica e le condizioni ambientali in cui si trova l'organismo in questione. Per avere un'idea poi delle dimensioni basti pensare che ci sono molte più proteine in un proteoma che geni in un genoma (si stima che i geni umani siano circa 100.000, e se, per approssimazione da ogni gene si esplicano 10 proteine, tenendo conto dello *splicing* differenziale dell'mRNA e delle modificazioni post traduzionali, nell'uomo le dimensioni del proteoma potrebbero essere di circa 1.000.000 di proteine). La variabilità del contenuto proteico di una cellula, di un tessuto, organo od organismo in generale, è da associare a diverse possibili cause, quali cambiamenti dovuti a malattie, risposte a stimoli esterni, oppure il normale svolgimento delle operazioni che conducono a sviluppo e maturazione. Appare chiara quindi l'importanza di un approccio globale allo studio di tali e tanti stadi biologici, che ci permetta di correlare la presenza, l'assenza o il diverso livello di espressione di una proteina ad un determinato momento o stadio fisiologico, specchio di una precisa condizione. Le possibili applicazioni di tale disciplina scientifica sono vastissime, senza trascurare il fatto che l'analisi del proteoma, nel vero senso della parola, ha come obiettivo lo studio e la caratterizzazione di tutte le proteine di una cellula, tessuto o organismo, e include anche le proteine ancora sconosciute (Klose, 1999).

### 1.3.2 Tecnologie proteomiche

L'analisi del proteoma è una disciplina scientifica emergente, che consente un approccio allo studio dell'espressione genica da un punto di vista globale, attraverso una combinazione di tecnologie che consentono di risolvere, identificare, quantificare e caratterizzare le proteine (Wilkins *et al.*, 1997). In un progetto proteomico, il primo passo consiste nel comprendere il tipo di campione da analizzare, decidendo quali proteine vogliamo separare e caratterizzare. Una volta preparato correttamente il campione, i vari polipeptidi vengono separati tramite analisi bidimensionale e/o MudPIT (*multi dimensional protein identification technology*). La tecnologia MudPIT, di recente introduzione, consente di raggiungere lo scopo della ricerca in un modo più diretto e veloce. Il campione da analizzare viene sottoposto a digestione enzimatica al fine di frammentare le proteine in peptidi. Il campione viene iniettato in HPLC e sottoposto a separazioni in una colonna a scambio ionico; ogni frazione ottenuta da questo passaggio è automaticamente caricata in una colonna a fase inversa e da questa passa direttamente in spettrometria di massa. Questa metodologia richiede un notevole investimento in strumentazione e soprattutto in *software* per l'analisi dei dati ma, sembra essere, al momento, la tecnologia più affidabile.

L'elettroforesi bidimensionale (focalizzazione isoelettrica con gradienti di pH immobilizzati in prima dimensione ed elettroforesi in gradiente di poliacrilamide e SDS in seconda dimensione) è stata, per diversi anni, la metodica di elezione per lo studio della composizione proteica di campioni cellulari e per il monitoraggio dei cambiamenti nell'attività dei geni. Infatti la 2D-PAGE permette un'analisi quantitativa e qualitativa delle migliaia di proteine che cooperano al mantenimento delle funzioni biologiche. Le proteine sono, infatti, i veri effettori biologici e le mappe bidimensionali sono uno strumento potente per rilevarli ed analizzarli (Celis and Gromow, 1999). Le immagini bidimensionali ottenute vengono poi analizzate con particolari programmi computerizzati che consentono di valutare tutte le differenze quali-quantitative che possono essere presenti tra campioni differenti. La

tecnica più utilizzata per l'identificazione proteica è la spettrometria di massa che, tramite il rapporto massa/carica, identifica le proteine. La spettrometria di massa permette, inoltre, di determinare e caratterizzare le modificazioni post-traduzionali delle proteine. Infine, la scienza del proteoma si avvale dell'ausilio indispensabile della bioinformatica che ha il compito fondamentale di fornire programmi specifici e maneggevoli per organizzare e decifrare le migliaia di informazioni che vengono prodotte e per permettere l'immagazzinamento di queste in banche dati.



**Figura 6:** Schema di un progetto proteomico

### 1.3.3 Spettrometria di massa *MALDI-ToF*

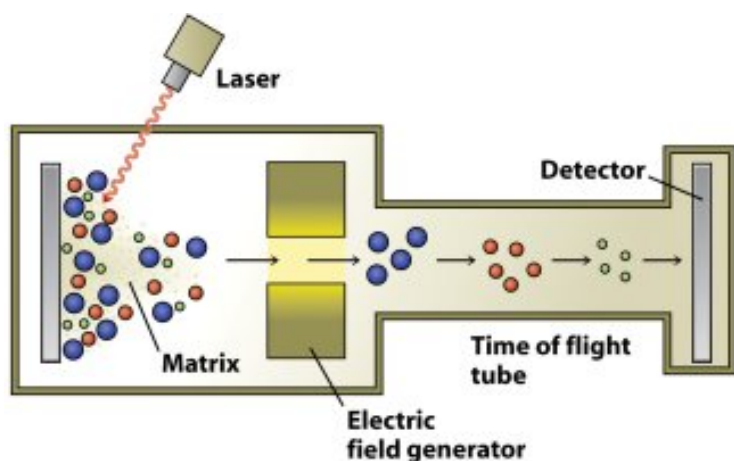
La tecnica di ionizzazione *MALDI* (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*), avvenuta alla fine degli anni ottanta, ha esteso l'uso della spettrometria di massa ad applicazioni di tipo biologico e biotecnologico. La possibilità di ottenere una ionizzazione non distruttiva ha consentito l'analisi di macromolecole, come proteine, polimeri ed acidi nucleici, per ricavarne una misura accurata della massa molecolare ( $M_r$ ), elemento essenziale per l'identificazione della molecola in esame. La conoscenza di tale parametro, infatti, è la prima tappa per confermare una sequenza peptidica o proteica e per evidenziare la presenza di modificazioni subite dalla molecola, come mutazioni, modifiche post-traduzionali, ossidazioni o deamidazioni. La *MALDI* mostra una rilevante tolleranza nei confronti d'impurezze e componenti meno volatili presenti nella soluzione tampone. Il campione da analizzare in spettrometria di massa, *MALDI-ToF* (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight*), viene mescolato con un eccesso molare di una matrice (2'-6' diidrossiacetofenone; acido gentisico;  $\alpha$ -cyano-4-acido idrossicinnamico; acido ferulico o acido sinapinico) e lasciato co-cristallizzare con essa dopo averlo depositato su una piastra di acciaio inox con 96 posti. Il processo di ionizzazione *MALDI* prevede l'irradiazione con una luce laser pulsata ( $\lambda$  337 nm, per un laser ad azoto) dello *spot*, contenente il campione co-cristallizzato con la matrice organica dotata di protoni acidi ed un cromoforo, in condizioni di alto vuoto. La maggior parte dell'energia ricevuta viene assorbita dalle molecole della matrice, provocando un'eccitazione elettronica e vibrazionale, parte della quale viene trasferita alle molecole di analita.

Dopo l'impulso del laser, gli ioni desorbiti vengono estratti, focalizzati ed accelerati verso il rivelatore.

Gli analizzatori *ToF* sono basati sul semplice principio che, fissata la distanza tra sorgente e rivelatore, il tempo impiegato da uno ione per raggiungere il rivelatore risulta direttamente proporzionale alla radice quadrata della massa dello ione stesso.



Utilizzando come calibrazione il tempo di volo, nelle stesse condizioni, di proteine standard note si ottiene una misura del rapporto massa/carica ( $m/z$ ) per lo ione di interesse. I principali vantaggi del *MALDI-ToF* sono di consentire la misura di masse elevate (fino ad alcune centinaia di KDa), di essere applicabile ad una varietà di analiti in un ampio intervallo di pesi molecolari, di presentare sensibilità elevate dell'ordine di  $10^{-12}$  moli, ed infine di permettere lo svolgimento delle analisi in maniera veloce ed automatizzabile. Accanto a questi vantaggi la tecnica presenta anche alcuni svantaggi, tra cui l'impossibilità di un collegamento dello spettrometro con tecniche separative, ad esempio la cromatografia liquida e l'elettroforesi capillare.



**Figura 7:** funzionamento dello spettrometro *MALDI-ToF*.

## 1.4 Obiettivo del progetto di tesi

La risposta delle piante a stress abiotici, quali alte o basse temperature, carenza idrica, stress ossidativi, stress osmo-salini e stress da metalli pesanti, riveste notevole importanza per le implicazioni che può avere sulla produttività delle piante.

Dai dati riportati finora in letteratura è possibile affermare che la risposta allo stress è essenzialmente universale e, quindi, fondamentale per la sopravvivenza degli organismi viventi perché parte integrante dei processi di adattamento delle popolazioni agli ambienti naturali in cui esse vivono.

Presso i laboratori del centro di ricerca Metapontum Agrobios, dove è stata svolta l'attività sperimentale inerente il lavoro di questa tesi, è in atto un progetto di ricerca: “**HSP MEDICA**”. L'obiettivo del progetto è quello di sviluppare una tecnologia per l'isolamento e lo studio di proteine HSP indotte da shock termico su piante di erba medica (*Medicago sativa*). L'interesse societario è dettato dalla potenzialità che queste molecole potrebbero avere nella produzione farmaceutica di vaccini o nelle terapie basate sulla risposta immunitaria come, ad esempio, quelle relative a malattie tumorali.

Il lavoro di questa tesi si inserisce in questo progetto con l'obiettivo di studiare, a livello proteomico, le differenze tra piante di erba medica controllo e piante sottoposte a stress termico.

Le proteine totali estratte da *Medicago sativa* sono state, infatti, analizzate tramite elettroforesi bidimensionale ed i profili proteomici confrontati al fine di individuare le proteine coinvolte nella risposta allo stress.

# Capitolo 2

## Materiali e metodi

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 Materiale vegetale e campionamento

Le varietà di erba medica (*Medicago sativa*) utilizzate nel lavoro di tesi sono state le var. “classe”, “quattro cascine” e “romagnola” i cui semi sono stati forniti dall’Istituto di Miglioramento Genetico Vegetale di Perugia e dall’Istituto del Germoplasma di Bari. La semina è stata effettuata in cassettoni (dimensioni 20x30x14 cm), contenenti torba e le piantine sono state fatte crescere per 11 giorni in serra ad una temperatura di 20-40°C. Dopo questo periodo le piantine sono state trasferite in camera di crescita e sottoposte ad un fotoperiodo di 16 ore di luce bianca (intensità di 4000 Lux) e 8 ore di buio per 2 giorni in modo tale che si acclimatassero a una temperatura costante di 20°C.

Per ogni esperimento sono state previste 4 cassette di erba medica, due per il controllo (CNTRL) e due per l’induzione dello shock termico (HS). Per ogni cassetta sono stati effettuati due campionamenti per un totale di 8 campioni di materiale vegetale (4 CNTRL e 4 HS). Ogni campione è stato utilizzato in maniera individuale.

### 2.2 Induzione dello shock termico

Attività sperimentali condotte in precedenza su “**PROGETTO HSP MEDICA**” hanno portato alla definizione dei parametri da utilizzare negli esperimenti di induzione dello shock termico.

Le piantine sono state sottoposte a shock termico in una stufa da laboratorio, ad una temperatura di 50°C per 1 ora. Dopo 1 ora dal trattamento le piantine, fusto e foglie, sono state tagliate, congelate in azoto liquido e conservate a -40°C.

## 2.3 Estrazione di proteine

Al fine di ottenere un estratto proteico quantitativamente e qualitativamente idoneo ad un'analisi bidimensionale, il materiale vegetale è stato processato seguendo diversi protocolli. Fatta eccezione per l'estrazione con Tris-NaCl, si tratta di protocolli per estrazione di proteine totali.

- Estrazione con fenolo

0.250 g di tessuto liofilizzato (o 2.50 g di tessuto fresco) sono stati pesati e pestati in un mortaio, aggiungendo azoto liquido. Alla polvere ottenuta sono stati aggiunti 2.5 ml di *media extraction* (0.1 M Tris-HCl pH 8.8, 10 mM EDTA, 0.4%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.9 M saccarosio) e 2.5 ml di fenolo equilibrato con Tris HC pH 8.8. Dopo un'incubazione di 30 minuti in ghiaccio e sotto agitazione, i campioni sono stati centrifugati per 20 minuti a 3500xg a 4°C.

La fase fenolica (parte superiore del surnatante) è stata recuperata. L'estrazione è stata ripetuta aggiungendo altri 2.5 ml di fenolo equilibrato con Tris-HCl pH 8.8 e 2.5 ml di *media extraction*. All'estratto fenolico sono stati aggiunti 5 volumi di ammonio acetato 0.1 M disciolto in metanolo 100% (conservato a -20°C) e dopo una veloce agitazione su vortex, i campioni sono stati lasciati *over night* (O.N.) a 4°C. Le proteine precipitate sono state separate dal surnatante tramite una centrifugazione a 20,000xg per 20 minuti a 4°C. Il pellet è stato lavato due volte con 5 ml di ammonio acetato 0.1 M disciolto in metanolo 100% (conservato a -20°C), agitando su vortex per 10-15 secondi. Dopo ogni lavaggio i campioni sono stati lasciati a -20°C per 20 minuti. Le proteine sono state successivamente precipitate con una centrifugazione di 20 minuti a 20,000xg a 4°C. Il materiale proteico è stato sottoposto a due successivi lavaggi con 5 ml e 2 ml di acetone 80% ed un lavaggio con 1 ml di etanolo al 70%. Ogni lavaggio ha previsto una agitazione su vortex per qualche secondo ed una successiva centrifugazione di 20 minuti a 20,000xg a 4°C.

Dopo l'ultimo lavaggio, il campione è stato risospeso in 1 ml di acetone 100%, e conservato a -20°C.

- Estrazione con SDS

0.300 g di tessuto liofilizzato (o 3 g di tessuto fresco) è stato pesato e pestato in un mortaio aggiungendo azoto liquido. Alla polvere ottenuta sono stati aggiunti 2.5 ml di *media extraction* (0.175 M Tris-HCl, SDS 5%, glicerolo 15%,  $\beta$ -mercaptoetanololo 50 mM). Dopo un'incubazione per 15 minuti a temperatura ambiente e in agitazione, i campioni sono stati centrifugati per 20 minuti a 5000xg a 4°C. Dopo la centrifugazione è stato recuperato il surnatante e sono stati aggiunti 4 volumi di acetone 100% (conservato a -20°C), incubandolo O.N. a -20°C. Le proteine precipitate sono state separate tramite una centrifugazione a 5000xg a 4°C. Dopo la centrifugazione è stato eliminato il surnatante e sono stati fatti due lavaggi con 2 ml di acetone 100% (conservato a -20°C) e due lavaggi con 2 ml di acetone 80% (conservato a -20°C). Ogni lavaggio ha previsto una agitazione su vortex per qualche secondo ed una successiva centrifugazione di 20 minuti a 20,000xg a 4 °C. Dopo l'ultimo lavaggio, il campione è stato risospeso in 400  $\mu$ l di IPG1 (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS e 40 mM TRIS base) e conservato a -20°C.

- Estrazione con Tris – NaCl

È stato pesato 0.250 g di tessuto liofilizzato (o 250 g di tessuto fresco), in un mortaio aggiungendo azoto liquido. Alla polvere ottenuta sono stati aggiunti 10 ml di tampone TRIS-HCl 50 mM e NaCl 150 mM. Dopo un incubazione di 15 minuti in ghiaccio e in agitazione, i campioni sono stati centrifugati per 20 minuti a 20,000xg a 4°C. Dopo la centrifugazione è stato recuperato il surnatante, al quale è stato aggiunto un quarto del volume di acido tricloroacetico (TCA) ed è stato lasciato incubare O.N. a -20°C, per favorire la precipitazione delle proteine. Le proteine precipitate sono state separate tramite

una centrifugazione a 20,000xg a 4°C. Dopo la centrifugazione è stato eliminato il surnatante e sono stati fatti due lavaggi con 2 ml di acetone 100% (conservato a -20°C) e due lavaggi con 2 ml di acetone 80% (conservato a -20°C). Ogni lavaggio ha previsto una agitazione su vortex per qualche secondo ed una successiva centrifugazione di 20 minuti a 20,000xg a 4 °C.

Dopo l'ultimo lavaggio, il campione è stato risospeso in 400 µl di IPG1 e conservato a -20°C.

- Estrazione con acetone – TCA

È stato pesato 0.300 g di tessuto liofilizzato (o 300 g di tessuto fresco) in un mortaio aggiungendo azoto liquido. Per favorire la precipitazione delle proteine, alla polvere ottenuta sono stati aggiunti 10 ml di acetone contenente β-mercaptoetanolo 0.07% e TCA 10%. Dopo una incubazione O.N. a -20°C, le proteine precipitate sono state separate tramite una centrifugazione di 20 minuti a 20,000xg a 4°C. Dopo la centrifugazione, una volta eliminato il surnatante, sono stati fatti cinque 5 lavaggi con 5 ml di acetone 100% e β-mercaptoetanolo 60 mM (conservato a -20°C). Ogni lavaggio ha previsto una agitazione su vortex per qualche secondo ed una successiva centrifugazione di 20 minuti a 20,000xg a 4°C. Dopo l'ultimo lavaggio, il campione è stato fatto asciugare sotto flusso di azoto e successivamente risospeso in 2 ml di IPG1. Infine il campione è stato sottoposto a sonicazione per 15-30 minuti.

- Trattamento con tributil fosfina (TBP) e iodioacetamide (IAA)

Prima di essere separate tramite isoelettrofocalizzazione (prima dimensione), le proteine ottenute con i diversi metodi di estrazione, devono subire dei trattamenti che implicano la loro solubilizzazione, denaturazione e la riduzione per assicurare la rottura completa delle interazioni tra le proteine stesse. Il primo trattamento ha previsto l'incubazione per 90 minuti in agitazione a temperatura ambiente con TBF (tributil fosfina) aggiunta per ottenere una

concentrazione finale di 50 mM da una soluzione stock di 200 mM preparata in isopropanolo. La TBP è un agente riducente non carico, che rompe completamente i legami disolfuro intra- e inter-catena permettendo quindi la solubilizzazione di miscele complesse di proteine. Il secondo passaggio ha previsto l'incubazione per 90 minuti in agitazione a temperatura ambiente con IAA (iodioacetoammide) aggiunta per ottenere una concentrazione finale di 25 mM da una soluzione stock di 200mM preparata in acqua. La IAA alchila i ponti disolfuro, in modo da impedire con l'ingombro sterico la loro riformazione. Gli estratti proteici trattati sono stati poi precipitati con 4 volumi di acetone : metanolo (8:1) e conservati a -20°C O.N.. Per separare le proteine, i campioni sono stati centrifugati a 20,000xg per 30 minuti a 4°C. Dopo la centrifugazione è stato eliminato il surnatante ed il pellet è stato lavato con 1 ml di acetone 100% conservato a -20°C. Successivamente il pellet è stato risospeso in 500 µl di soluzione IPG 2 (7 M Urea, 2 M Thiourea, 2% CHAPS, Triton 1%).

## **2.4 Determinazione della concentrazione proteica con il metodo Bradford (BIO-RAD).**

Questo saggio (Bradford, Annal. Biochem. 72: 248, 1976) si basa sull'azione del colorante Coomassie Brilliant Blue G 250 che, tramite legami elettrostatici proteina-gruppi sulfonici del colorante in soluzione acida, forma composti con le proteine, colorati in "blu". Il colorante si lega specificatamente a residui di Arginina, Triptofano, Tiroxina, Istidina e Fenilalanina. La procedura è rapida e la sensibilità è sufficientemente elevata (0.2 mg/ml). La curva standard è stata preparata utilizzando una soluzione di BSA (albumina di siero bovino BIO-RAD) in acqua bidistillata ad una concentrazione di 7 mg/ml, dalla quale poi sono state fatte diverse diluizioni con la soluzione IPG 2 in modo da coprire un *range* di 0.5-7 µg proteina/µl.



I campioni proteici sono stati diluiti, con soluzione IPG 2, a diverse concentrazioni: 5X, 10X, 20X. Dai diversi campioni sono stati prelevati 20 µl e sono stati mescolati con 80 µl di HCl 0.12 N. Per la lettura allo spettrofotometro è stata utilizzata una piastra a 96 pozzetti, nella quale per ogni pozzetto sono stati aggiunti 10 µl della miscela di ogni campione e 190 µl di dye reagent (BIO-RAD protein assay) 1:4 diluito in acqua bidistillata. Per aumentare l'attendibilità dei risultati, sono state fatte due repliche per ogni campione. La piastra è stata lasciata per 15 minuti a temperatura ambiente eliminando, le bolle di aria formatesi sulla superficie di ogni pozzetto. La lettura è stata effettuata allo spettrofotometro Benchmark microplate reader (BIO-RAD) avvalendosi del programma Microplate manager 4.0 (BIO-RAD) alla lunghezza d'onda di 595 nm. I dati di lettura sono stati poi elaborati su foglio excel.

## **2.5 Preparazione dei gel di poliacrilammide (PAA).**

Sono stati preparati gel di PAA a porosità costante ad una concentrazione del 12%, di due differenti dimensioni: da 7 cm e 17 cm. I gel piccoli sono stati preparati in un Mini Protean 3 Multi Casting Chamber (BIO-RAD), utilizzando vetri con spaziatori da 1mm di spessore. I gel grandi sono stati preparati in un Protean II Multi Gel Casting Chamber (BIO-RAD), utilizzando per l'assemblaggio dei vetri, spaziatori da 1 mm di spessore.

Per ogni gel piccolo da polimerizzare sono stati versati circa 5 ml di soluzione di PAA, mentre per i gel grandi sono stati versati circa 30 ml di soluzione di PAA. Dopo aver versato la soluzione di PAA, tra i vetri, sono stati aggiunti 150 µl di butanolo per i gel piccoli e 1 ml per i gel grandi. Questa operazione serve a limitare l'evaporazione durante il tempo di polimerizzazione.

Composizione per 10 ml di soluzione:

- |                      |         |
|----------------------|---------|
| 1. H <sub>2</sub> O  | 3.35 ml |
| 2. PAA (30%)         | 4 ml    |
| 3. TRIS 1.5 M pH 8,8 | 2.5 ml  |
| 4. SDS 10%           | 100 µl  |
| 5. APS 10%           | 50 µl   |
| 6. TEMED             | 5 µl    |

Gli agenti polimerizzanti TEMED ed APS (ammonio persolfato) sono stati aggiunti dopo che la soluzione è stata fatta degassare per circa 15 minuti, in una campana di vetro collegata ad una pompa da vuoto. Per quanto riguarda la preparazione della soluzione di PAA dei gel grandi, la quantità di TEMED è stata dimezzata per prolungare il tempo di polimerizzazione.

## **2.6 Analisi bidimensionale.**

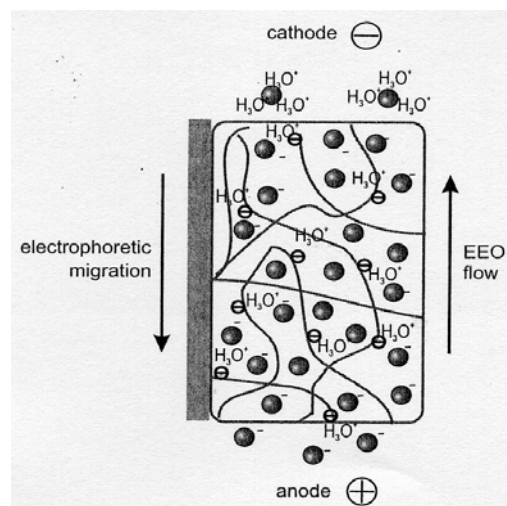
### **2.6.1 La prima dimensione: isoelettrofocalizzazione.**

L'isoelettrofocalizzazione (IEF) è una tecnica elettroforetica che separa miscele complesse di proteine in funzione del punto isoelettrico (pI), valore di pH al quale il numero di cariche positive e di quelle negative sono equivalenti e, di conseguenza la proteina non mostra alcuna tendenza a migrare verso l'anodo o il catodo.

Per l'IEF si utilizzano attualmente *strip* di matrice poliacrilamidica a gradiente di pH immobilizzato. La tecnologia dei *gel strip* permette la creazione di spettri di pH di qualsiasi ampiezza all'interno di un *range* di pH 3-12. La regione anodica (+) sarà quella più acida e quella catodica (-) quella più basica. Gli estremi di pH vengono scelti sulla base dei punti isoelettrici dei componenti da separare. È una tecnica di un

elevatissimo potere risolutivo ed è impiegata in particolare nella preparazione di isoenzimi: è, infatti, sufficiente una differenza in punti isoelettrici di sole 0.01 unità di pH per ottenere una separazione apprezzabile. Nel corso delle attività sperimentali condotte, in un primo momento sono stati utilizzati *gel strip* da 7 cm al fine di poter verificare la qualità dell'estratto proteico ottenuto per ogni campione, confrontare i valori di concentrazione ottenuti tramite il saggio Bradford (BIO-RAD) e definire il *range* di pH più adatto da utilizzare. Per questo scopo, sono stati provati *gel strip* a diverso *range* di pH. Per ogni campione, sono state, inoltre, utilizzate diverse quantità di estratto proteico, per la reidratazione dei *gel strip*. Successivamente sono state utilizzate *gel strip* da 17 cm per poter effettuare le analisi bidimensionali.

Le soluzioni ottenute sono state utilizzate per la reidratazione di ReadyStrip Ipg Strips (BIO-RAD), lunghe sia 7 cm (A) che 17 cm (B). Per A, il volume di soluzione delle proteine estratte, corrispondente a 100-300 µg, è stato risospeso in un volume finale di 125 µl di soluzione IPG 2 contenente 0.0002% di blu-bromofenolo e 0.2% di Ampholite Bio-Lyte (BIO-RAD) specifici per il *range* utilizzato. Per B, il volume di soluzione delle proteine estratte, corrispondente ad una concentrazione di 1 e 2 mg, è stato risospeso in un volume finale di 300 µl con la stessa soluzione utilizzata precedentemente. La fase di reidratazione è durata per A, O.N. e per B 24 ore. Una volta terminata la fase di reidratazione le *strip* sono state trasferite in un'apposita piattaforma suddivisa in più tracce, larghe quanto le matrici stesse (Figura 7). Per assicurare il contatto del gel con i fili di platino degli elettrodi, visibili ai due estremi di ogni scanalatura, è stato necessario aggiungere due brevi pezzetti di carta (carta da filtro) inumidita con acqua bidistillata. La quantità di acqua per consentire il collegamento è piuttosto ridotta pertanto i pezzetti di carta sono stati tamponati accuratamente per evitare che, per l'eccessiva presenza di acqua in prossimità degli elettrodi si possa sviluppare un flusso elettroendosmotico (Figura 8).



**Figura 8** flusso elettroendosmotico che si sviluppa durante la corsa elettroforetica a seguito della ionizzazione dell'acqua. L'eccessiva migrazione di acqua verso le regioni estreme del gradiente può disidratare il gel fino a farlo bruciare.

Tale operazione consente il passaggio della corrente e la focalizzazione delle proteine contenute nel campione. Dopo la preparazione, la camera elettroforetica è stata posizionata a contatto con gli elettrodi del Protean IEF Cell (BIO-RAD) ( Figura 9), e ogni *gel strip* è stato ricoperto con olio minerale (BIO-RAD), per ridurre il contatto con l'aria, limitare l'effetto elettroendosmotico generato dall'anidride carbonica, l'evaporazione della soluzione di solubilizzazione e la successiva cristallizzazione dell'urea.

### Focalizzazione isoelettrica



**Figura 9:** Protean IEF Cell ( BIO-RAD)

Il Protean IEF (BIO-RAD) è stato programmato con accuratezza tenendo in considerazione il numero dei *gel strip* utilizzati per ogni esperimento, la loro dimensione ed i *range* di pH utilizzati. (Tabella 2)

	Vtaggio Iniziale	Vtaggio Finale	Volt/Ora	Incremento Di Vtaggio	temperatura
7 cm	0 V	4,000 V	8-10,000	Veloce	20°C
17 cm	0 V	10,000 V	40-60,000	Veloce	20°C.

**Tabella 2:** Condizioni di focalizzazione per ReadyStrip pH 3-10, 4-7, 5-8

	Vtaggio Iniziale	Vtaggio Finale	Volt/Ora	Incremento di Vtaggio	temperatura
7 cm	0 V	4,000 V	8-10,000	Veloce	20°C

**Tabella 3:** Condizioni di focalizzazione per ReadyStrip pH 3-6

<b>Step 1</b>	Vtaggio Iniziale	Vtaggio Finale	Tempo della corsa	Incremento Di Vtaggio	temperatura
7 cm	0 V	250 V	15 minuti	Veloce	20°C
<b>Step 2</b>	Vtaggio Iniziale	Vtaggio Finale	Tempo della corsa	Di Vtaggio	Incremento temperatura
7 cm	250 V	4,000 V	1 ora	Lento	20°C
<b>Step 3</b>	Vtaggio Iniziale	Vtaggio Finale	Incremento Volt/Ora	Di Vtaggio	temperatura
7 cm	4,000 V	4,000 V	10-20,000	Veloce	20°C

**Tabella 4:** Condizioni di focalizzazione per ReadyStrip pH 4.7-5.9

Il vtaggio finale per ogni *range* di pH potrebbe non essere raggiunto ma complessivamente i Volt orari della tabella sono sufficienti per focalizzare correttamente le proteine anche se si raggiunge un vtaggio finale di soli 3000 V per i gel di 7 cm e 7000 V per i gel di 17 cm.

## 2.6.2 Equilibratura dei gel strip

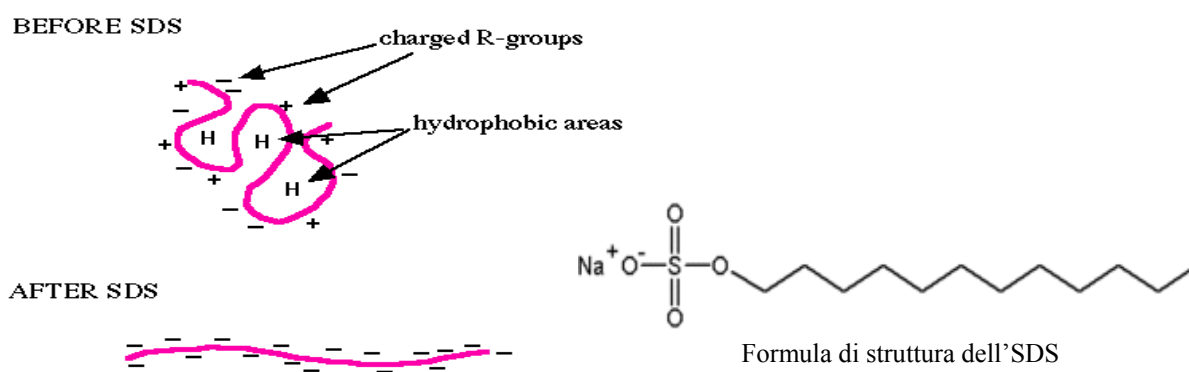
A questo punto le proteine sono incorporate nei *gel strip* e separate in base al loro punto isoelettrico. Ma le matrici devono essere adeguatamente equilibrate prima di essere interfacciate con il gel di poliacrilamide. Ogni *gel strip* è stato trasferito in un tubo contenente la soluzione di equilibratura, costituita da: Urea 6 M, SDS 2%, TRIS/HCl pH 8.8 50 mM, Glicerolo 20%. Ogni *gel strip* è stato sottoposto a due passaggi equilibranti di 10 minuti ciascuno. Le soluzioni equilibranti hanno la seguente composizione:

Il TRIS impedisce cambiamenti di pH. L'Urea ed il glicerolo servono come agenti solubilizzanti e riducono l'effetto elettroosmotico. Il trattamento con SDS maschera la carica intrinseca delle proteine e ne apre i ponti disolfuro, permettendo una maggior denaturazione. L'equilibratura prevede due passaggi, ciascuno della durata di dieci minuti in agitazione. Nel primo passaggio, in ciascun tubo, sono stati utilizzati 6 ml di soluzione di equilibrio (EQ) contenente Tributillfosfina (TBP) ad una concentrazione finale pari a 5 mM. La Tributillfosfina è un agente riducente non carico che rompe i legami disolfuro intra- e inter-catena migliorando la solubilità delle proteine e il trasferimento alla seconda dimensione. Per il secondo passaggio, la soluzione contenuta nei tubi è stata sostituita con 6 ml di soluzione EQ contenente Iodioacetammide (IAA) ad una concentrazione finale pari a 20 mM. La IAA alchila i ponti disolfuro aperti nel trattamento con TBP in modo da impedire con l'ingombro sterico la loro riformazione.

### 2.6.3 La seconda dimensione: SDS-PAGE

La seconda dimensione in una mappa bidimensionale è costituita da una separazione elettroforetica in presenza del detergente sodio dodecil solfato (SDS).

Il principio separativo in questa fase è fondato dalla capacità del detergente anionico, SDS, di legarsi alle proteine mediante la sua porzione idrofobica, mascherando la carica intrinseca in modo che assumano tutta la stessa densità di carica e mobilità elettroforetica in fase libera (Figura 8).



**Figura 10:** L'elevata carica negativa (la forza di repulsione che le cariche negative esercitano fra di loro) conferita alla catena polipeptidica la rende praticamente lineare.

Quindi le proteine, ricoperte di questo detergente vengono fatte migrare in un gel setacciante di acrilamide a porosità variabile. L'SDS si lega alle proteine secondo un rapporto costante, che corrisponde a 1.4 g di SDS per grammo di proteina. La migrazione in SDS-PAGE è proporzionale solo alla massa molecolare, le molecole proteiche complessate all'SDS avranno tutte carica negativa e quindi migreranno tutte verso l'anodo. La determinazione della massa molecolare di proteine in SDS viene effettuata sulla base del fatto che esiste un rapporto lineare tra il log Mr (massa relativa) ed il valore Rf (mobilità relativa), per gel a gradiente di porosità, o il %T (concentrazione percentuale di gel) per gel a porosità costante.

Terminate quindi le fasi di isoelettrofocalizzazione e condizionamento, i *gel strip* sono stati sottoposti ad una separazione ortogonale alla prima, mediante SDS-PAGE, condotta utilizzando un sistema orizzontale, su gel della BIO-RAD: Mini Protean Dodeca Cell, per i gel piccoli e Protean Plus Dodeca Cell, per i gel grandi. Entrambi i sistemi di separazione sono stati collegati a un impianto di refrigerazione, che permette alla temperatura del buffer di rimanere costante a 15°C. Il buffer di corsa è costituito da TRIS-Glicina 1X (pH 8.3): TRIS 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%.

I *gel strips* sono stati posti sui gel di PAA al 12% preparati precedentemente, in modo tale da evitare la formazione di bolle di aria. Dopo questa operazione, sul lato sinistro dei *gel strips* piccoli sono stati inseriti dei pezzettini di carta da filtro, imbibiti con 6 µl di *Standard* SDS-PAGE Low range (BIO-RAD). Mentre per i gel grandi, sono stati inseriti sul lato sinistro 15 µl dello stesso standard, in un pezzettino di cannuccia, lunga circa 1 cm. Infine per bloccare il tutto, è stato versato gel di agarosio allo 0.5 % in buffer di corsa contenente blu-bromofenolo. Per gel piccoli, la corsa è stata condotta a 50 mA per gel per un ora, poi l'intensità è stata raddoppiata per ogni ora (circa 210 minuti) successiva fino alla fine della corsa. Per i gel grandi la corsa è stata condotta a 200 V per 360 minuti.

## **2.7 Colorazione con Blue Silver**

Affinché le proteine si fissino al gel, è stato necessario lasciare i gel in agitazione in una soluzione acquosa costituita dal 40% metanolo ed il 10% acido acetico glaciale.

Sia per quanto riguarda la fase di fissaggio che di colorazione, i gel piccoli sono stati messi in contenitori di plastica posti su un agitatore, mentre i gel grandi sono stati posti in un Dodeca Stainer Small (BIO-RAD). Il tempo necessario per il fissaggio è stato circa un ora, per la colorazione O.N. Per la visualizzazione delle



proteine sui gel di PAA, è stato utilizzato il metodo di colorazione colloidale riportato nell'articolo di Candiano *et al.*, 2004. Questo è un processo di colorazione progressivo, in cui il colorante Brilliant Blue G 250, comunemente chiamato Blue Coomassie, forma dei microprecipitati. La colorazione avviene tramite interazioni di natura idrofobica. La forza delle interazioni idrofobiche è aumentata dalla presenza dell'ammonio solfato in soluzione, permettendo una sensibilità di circa 100 ng. La concentrazione del colorante libero è molto bassa cosicché la colorazione dello sfondo risulta essere minima. Tuttavia i microprecipitati agiscono da riserva di molecole di colorante, assicurando che sia presente una sufficiente quantità di colorante libero per poter occupare tutti i siti di legame su tutte le proteine, a condizione che il tempo di colorazione sia sufficientemente lungo, per poter permettere il raggiungimento dello stato stazionario. La soluzione di colorazione ha la seguente composizione: 10% (peso-volume) di acido ortofosforico ed il 10% (peso-volume) di ammonio solfato e 20% (peso-volume) metanolo. Per preparare la soluzione, nel Beker, posto su un agitatore magnetico, contenente un decimo del volume finale di acqua bidistillata, vengono aggiunti in successione; il volume finale di acido ortofosforico, quello di ammonio solfato e quando tutti i componenti sono stati solubilizzati si aggiunge il Brilliant Blue G 250. Solo quando la soluzione appare omogenea si aggiunge acqua bidistillata, fino a raggiungere l'80% del volume finale e si completa la soluzione con il metanolo.

## **2.8 Elaborazione informatica dei dati**

Dopo colorazione i singoli gel bidimensionali sono stati acquisiti facendo uso dello scanner GS 800 Calibrated Densitometer (BIO-RAD) per ottenere le immagini da analizzare con il programma PDQuest 2-D analysis *Software* (BIO-RAD, versione 7.2).

Il primo *step* dell'analisi è la preparazione delle immagini che devono essere comparate. Le immagini dei gel devono essere perfettamente dritte, ed eventualmente tagliate per ottenere immagini di uguali dimensioni. Con queste operazioni preliminari, gli *spot* proteici ripetuti nei diversi gel da comparare, si ritrovano approssimativamente sempre nella stessa posizione. Lo *step* successivo è quello di identificare sulle immagini gli *spot* significativi sulla base della loro dimensione (area) ed intensità (volume). Il *software* chiede all'operatore di identificare, nell'immagine dei gel, uno *spot* debole, uno piccolo e uno grande. Solo successivamente il *software* elabora i valori da attribuire ai parametri che portano alla definizione di uno *spot* significativo: *Sensitivity*, *Scale Size* e *Minimum peak volume*.

Altri parametri importanti sono lo *Streaking factor* e lo *Speckle factor*. Il primo tiene conto della possibile diffusione di uno *spot* sia in senso verticale che orizzontale; il secondo della presenza di *spot* intensi ma non attribuibili a proteine. Entrambi questi fattori intervengono nel calcolo del *background* del gel e del grado di rumore di fondo che il computer determina ma che l'operatore può, eventualmente, adattare (modificare).

Per la definizione degli *spot* significativi sono stati determinati differenti *Set* di parametri scelti in funzione del metodo utilizzato per l'estrazione proteica. Solo dopo avere impostato i valori dei parametri il *software* procede automaticamente nella definizione degli *spot* significativi. Il *software* elabora l'immagine di ogni gel generando dapprima una immagine filtrata per ridurre o eliminare il *background* e, dopo aver identificato gli *spot* significativi, crea una immagine Gaussiana. Ogni *spot* presente sull'immagine Gaussiana è il risultato di una curva teorica ottenuta dall'elaborazione di una formula matematica strettamente correlata all'intensità dello stesso *spot* su gel. Gel appartenenti a repliche dello stesso campione vengono sottoposti a *Matchset*: l'immagine Gaussiana di ogni gel viene utilizzata dal computer per l'identificazione di *spot* uguali in gel differenti e per la comparazione delle intensità degli stessi *spot*. L'operatore può intervenire fornendo un valore di *level of stringency* (0-100) a ciascuna delle due elaborazioni successive del *Matchset*. Il

risultato dell'elaborazione è un *Master Gaussian* gel che l'operatore deve controllare e, talvolta, correggere manualmente, inserendo o eliminando *spot*, prima di procedere nel comparare campioni differenti, per esempio piante controllo (CNTRL) e piante trattate (*Heat Shock*) per identificare eventuali differenze. Il *software* assegna un numero di identificazione ad ogni *spot* in base alla sua posizione nel *master*: SSP (*standard spot number*). Il *software* suddivide il *master* con righe e colonne in una griglia in modo che all'interno di ciascun quadrante ci siano al massimo 100 *spot*. I primi due numeri dello SSP corrispondono a quello dell'ascissa e dell'ordinata partendo dall'origine, i successivi, da 0 a 99, vengono attribuiti progressivamente dal *software* agli *spot* partendo dal basso verso l'alto e poi da sinistra verso destra all'interno di ciascun quadrante. In generale, gli *spot* nella regione più in basso a sinistra dell'immagine hanno numeri bassi, quelli della parte più in alto a destra hanno numeri più alti.

Avendo condotto le analisi bidimensionali dei campioni in presenza di standard di peso molecolare (SDS-PAGE *Molecular Weight Standard Low Range* BIO-RAD) e di punto isoelettrico (2-D SDS-PAGE *Standards* BIO-RAD), è stato possibile individuare, sulle immagini dei *Master*, diversi punti di riferimento per consentire al *software* di calcolare per ogni *spot* valori di peso molecolare ( $M_r$ ) e punto isoelettrico (pI) teorici. Alcuni *spot* presentano un valore di punto isoelettrico negativo perché lontani dai punti di riferimento individuati.

Il *software* è capace di elaborare i dati ottenuti dal confronto delle immagini in modo diverso fornendo una serie di possibili criteri di analisi:

- **Valutazione qualitativa (Quali)** vale a dire il numero di *spot* presenti solo in campione CNTRL o solo nell'HS. Il *Software* definisce uno *spot* assente se il suo volume è 10 volte inferiore rispetto a quello dello stesso *spot* nel campione confronto.
- **Valutazione quantitativa (Quanti)** basata su differenze di espressione di uno stesso *spot* proteico presente nei campioni a confronto. L'analisi prevede che

sia l'operatore a decidere quanto uno *spot* debba essere più o meno intenso per essere incluso nell'analisi.

- **Valutazione statistica (Stati)** che può essere effettuata con diversi metodi tra i quali noi abbiamo scelto quello *Student's t-test* con il 95% di livello di significatività.

Con l'analisi *Boolean* è poi possibile combinare due o più set di analisi.

## **2.9 Identificazione degli spot tramite spettrometria di massa.**

Dopo aver effettuato l'acquisizione dell'immagine, i gel 2D sono stati posizionati fra due fogli di cellophane e posti in un Gel Air Dryer (BIORAD). I gel disidratati sono stati puliti accuratamente con un panno inumidito con metanolo, prima di tagliare gli *spot* selezionati per le analisi di spettrometria. Successivamente gli *spot* tagliati, riposti in Eppendorf opportunamente siglate sono stati inviati al laboratorio del CENTRO S.M.A.R.T. (Spettrometria di Massa Analitica per Ricerca Tecnologica) del Dipartimento di Chimica dell'Università degli Studi di Bari. Le analisi di spettrometria di massa sono state condotte utilizzando un Micromass MALDI-LR con analizzatore TOF (*time of flight*).

# Capitolo 3

## Risultati e discussione

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Confronto tra i diversi protocolli di estrazione

L'individuazione di un buon protocollo di estrazione è il primo passo in una analisi proteomica ed è sicuramente alla base di una buona analisi bidimensionale. Un efficiente protocollo di estrazione proteica dovrebbe essere riproducibile, capace di rimuovere DNA o altre molecole interferenti e dovrebbe essere in grado di prevenire la degradazione o la modificazione delle proteine estratte.

Proteine differenti possono avere distinte proprietà chimico-fisiche, tuttavia, può accadere che, queste stesse proprietà, non siano uguali in modo uniforme lungo una singola catena polipeptidica. Questa è una delle ragioni per cui è opportuno prendere in considerazione e provare più di una tecnica di estrazione nel corso delle attività sperimentali.

Il protocollo di estrazione, ideale per una analisi proteomica, dovrebbe essere in grado di estrarre, dalla matrice cellulare, il maggior numero possibile di proteine. Per questa ragione le tecniche, provate nel corso delle attività sperimentali inerenti la tesi, sono soprattutto di estrazione totale. Tuttavia, quando il pattern degli *spot* proteici sui gel bidimensionali appare troppo complesso e difficile da analizzare, potrebbe essere necessario ricorrere a tecniche di estrazione proteica selettiva che, basandosi sulle caratteristiche chimico-fisiche di uno specifico gruppo di proteine, riescono ad estrarre solo quelle molecole. Una tecnica di estrazione selettiva potrebbe essere utilizzata anche allo scopo di ridurre la quantità di proteine molto espresse che possono mascherare la presenza di altre molecole proteiche meno espresse. Un estratto proteico ottenuto da materiale vegetale risulterà essere sicuramente molto ricco in RuBisCO ed è per questa ragione che, tra i protocolli presi in considerazione nel corso delle attività sperimentali inerenti il lavoro di tesi, è stato inserito anche un protocollo di estrazione selettiva (estrazione con TRIS-NaCl).

La determinazione di concentrazione proteica mediante Saggio Bradford e l'analisi monodimensionale in SDS-PAGE possono fornire dati sulla quantità e qualità di un estratto proteico; tuttavia, è necessario condurre analisi bidimensionali su ciascun estratto al fine di poterne definire l'idoneità.

Nel corso delle attività sperimentali condotte, in un primo momento, sono stati utilizzati *gel strip* da 7 cm al fine di poter verificare la qualità dell'estratto proteico ottenuto per ogni campione, confrontare i valori di concentrazione ottenuti tramite il saggio Bradford (BIO-RAD) e definire il *range* di pH più adatto da utilizzare.

Nei gel bidimensionali, ciascuna proteina si presenta come uno *spot* più o meno intenso e definito. Se un gel presenta meno *spot* dell'atteso, è perché l'estratto proteico è ricco di proteine insolubilizzate che hanno difficoltà ad essere adsorbite dalla matrice degli IPG. La scarsa solubilità delle proteine nel campione, l'alta viscosità e/o la presenza di materiale non proteico nell'estratto costituiscono le principali cause di una cattiva focalizzazione nell'analisi bidimensionale che si manifesta con strisciate orizzontali nei gel. Strisciate verticali sui gel bidimensionali, sono spesso dovuti a problemi di corsa elettroforetica, ma, in alcuni casi, possono essere correlati alla qualità del materiale di partenza in cui le proteine tendono a perdere solubilità in prossimità del loro punto isoelettrico.

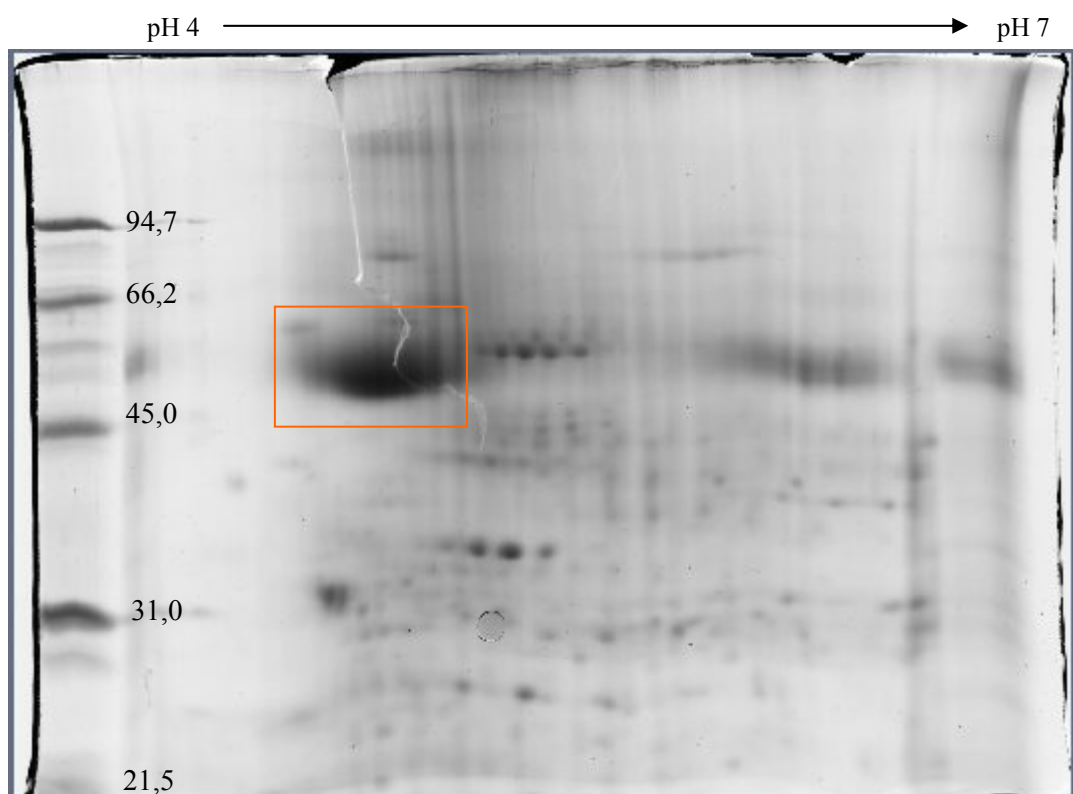
### **3.1.1 Estrazione con TRIS-NaCl**

In questo metodo di estrazione, utilizzato per le proteine solubili, il TRIS ha la funzione di stabilizzare il pH mentre il cloruro di sodio destabilizza i legami intermolecolari di natura elettrostatica, evitando la formazione di agglomerati.

La figura 11 mostra l'immagine di un gel bidimensionale ottenuto con proteine estratte con questa metodologia.

In generale, la separazione delle proteine in prima dimensione è stata discreta, ma ci sono delle strisciate in senso orizzontale. La separazione in seconda dimensione

non è stata ottimale e si può notare la presenza di strisciate verticali. Il numero di *spot* potrebbe essere quantitativamente sufficiente per condurre ulteriori analisi, ma, la loro bassa risoluzione le renderebbe sicuramente difficoltose. L'intensa strisciata orizzontale, situata a circa 60 KDa (rettangolo in figura 11), potrebbe essere dovuta all'abbondante presenza di RuBisCO. In letteratura è riportato che una strisciata analoga a questa, posta nella stessa posizione in gel bidimensionali di *Medicago truncatula*, è stata identificata come RuBisCO da Watson e dai suoi collaboratori (Watson *et. al.* 2003). Questa grossa strisciata potrebbe mascherare la presenza di altre proteine aventi stesso peso molecolare e punto isoelettrico della RuBisCO ma che si trovano nell'estratto in quantità minore.



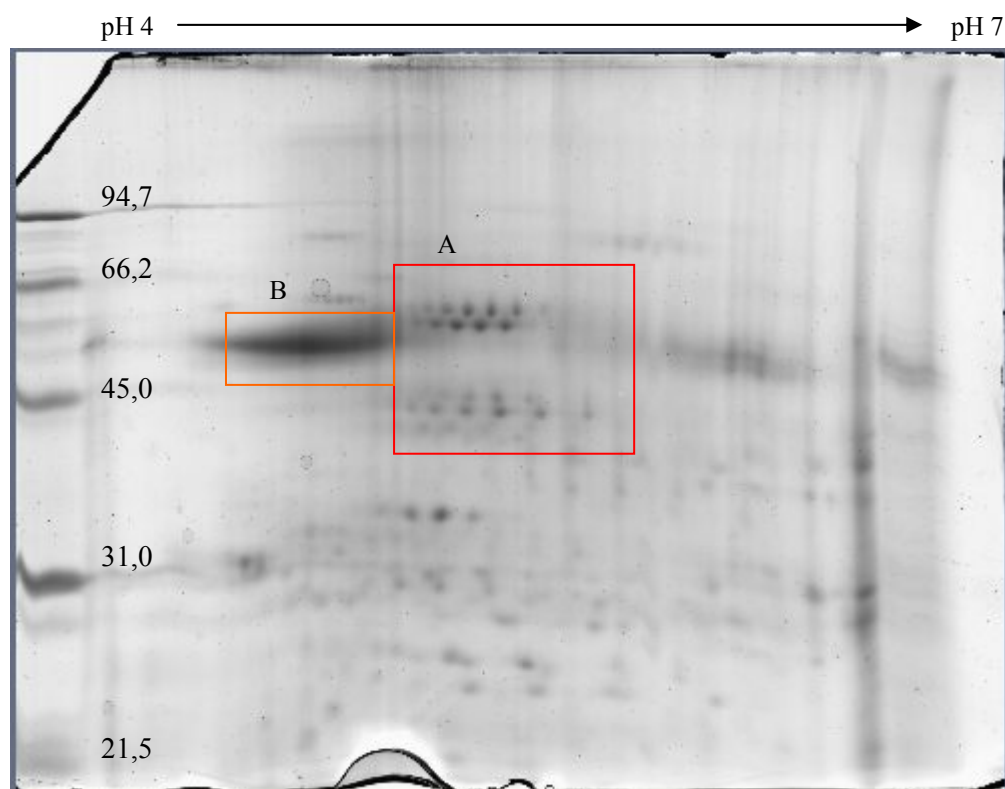
**Figura 11:** Gel bidimensionale di 200 µg di proteine estratte con TRIS-NaCl da erba medica (*Medicago sativa*) var. quattro cascine utilizzando *gel strip* con *range* di pH 4-7 (pH crescente da sinistra verso destra), gel di PAA al 12%. A sinistra si può osservare la corsa dello standard di peso molecolare ( SDS page standard low *range*, BIO-RAD cod 161-0304).



### 3.1.2 Estrazione con SDS

Questo metodo viene utilizzato per l'estrazione di proteine idrofile e di alcune proteine idrofobe. La figura 12 mostra l'immagine di un gel bidimensionale ottenuto con proteine estratte con questo protocollo.

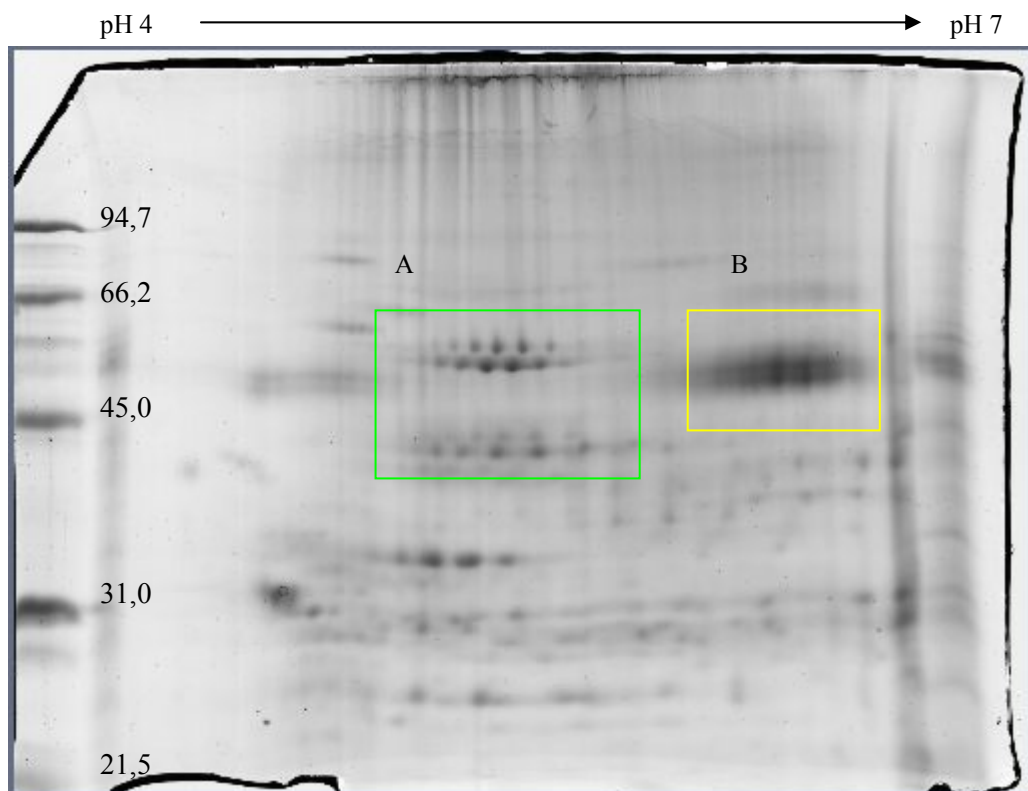
In generale, la separazione in prima dimensione è stata discreta ma, fatta eccezione degli *spot* che si trovano nella zona A che appaiono nettamente distinti e ben definiti, la maggior parte degli *spot* presenta una bassa definizione. In seconda dimensione la separazione è stata buona, ma la quantità degli *spot* non è sufficiente per condurre le successive analisi. L'intensa strisciata in senso orizzontale, visibile nella zona B, potrebbe, anche in questo caso, essere legata alla presenza della RuBisCO.



**Figura 12:** Gel bidimensionale di 200  $\mu$ g di proteine estratte con SDS da erba medica (*Medicago sativa*) var. quattro cascine utilizzando *gel strip* con range di pH 4-7 (pH crescente da sinistra verso destra), gel di PAA al 12%.

### 3.1.3 Estrazione con fenolo

Il fenolo ha la duplice funzione di rompere tutte le strutture cellulari e solubilizzare tutte le proteine nella fase organica; tutti i biopolimeri (amido, cellulosa, lignina, pectine, acidi nucleici) si ritrovano in fase acquosa o si stratificano sull'interfaccia con la fase fenolica. Questa tecnica, quindi, si presta bene per l'estrazione di proteine totali da tessuti vegetali. In generale, la separazione delle proteine, sia in prima che in seconda dimensione, è stata buona e le strisciate appaiono poco intense. Gli *spot* presenti nella zona A del gel, la cui immagine è riportata in figura 13, sono ben distinti e definiti, ma nel resto del gel non sono quantitativamente sufficienti per intraprendere ulteriori analisi. L'intensa strisciata orizzontale (zona B in figura 13), probabilmente dovuta all'abbondante presenza di proteine a peso molecolare e punto isoelettrico molto simile fra loro, potrebbe portare agli stessi problemi della RuBisCO descritti nelle precedenti estrazioni.

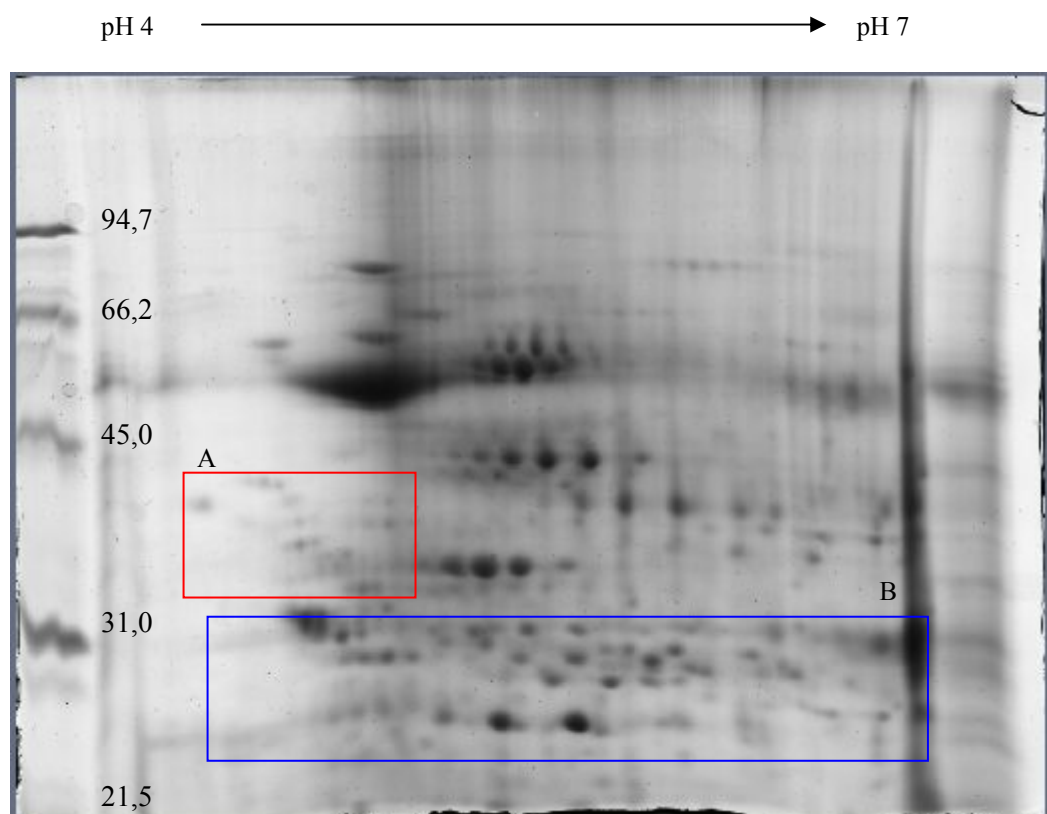


**Figura 13:** Gel bidimensionale di 200  $\mu$ g di proteine estratte con Fenolo da erba medica (*Medicago sativa*) var. quattro cascine utilizzando *gel strip* con range di pH 4-7, gel di PAA al 12%.

### 3.1.4 Estrazione con acetone e TCA

Il TCA ha la duplice funzione di rompere le strutture cellulari e di precipitare le proteine totali mentre l'acetone oltre a precipitare svolge anche funzione di solvente. La figura 14 mostra un gel bidimensionale ottenuto utilizzando proteine estratte con questo protocollo.

In generale, la separazione delle proteine, sia in prima che in seconda dimensione, è stata buona anche se, sui gel, sono presenti strisciate soprattutto verticali. Rispetto ai precedenti metodi di estrazione, questo protocollo si è rivelato buono soprattutto dal punto di vista quantitativo. Confrontando le immagini dei gel bidimensionali, riportati nelle figure precedenti, appare evidente come, nella figura 14, gli *spot* siano molto più numerosi, soprattutto nelle zone A e B.



**Figura 14:** Gel bidimensionale di 200  $\mu$ g di proteine estratte con acetone e TCA da erba medica (*Medicago sativa*) var. quattro cascine utilizzando *gel strip* con range di pH 4-7, gel di PAA al 12%.

### 3.1.5 Scelta del metodo di estrazione delle proteine

Osservando i gel bidimensionali degli estratti proteici ottenuti con i metodi descritti in 3.1.1. e 3.1.2., appare evidente che queste procedure non sono adatte all'estrazione di proteine da erba medica. Il pattern proteico ottenuto in entrambi i casi è incompleto perché le proteine idrofobe, evidentemente presenti in buona quantità in questa matrice, non vengono estratte. Pertanto, il numero degli *spot* presenti sui gel bidimensionali è molto basso e scarsa è la loro definizione.

Al contrario dell'estrazioni con TRIS-NaCl e SDS, quelle con fenolo e con acetone – TCA permettono di estrarre sia proteine idrofile che idrofobe fornendo un pattern proteico più completo. L'estrazione con fenolo offre il vantaggio di eliminare un grosso quantitativo di RuBisCO, ma, rispetto all'estrazione con acetone-TCA, riesce ad estrarre un minore numero di proteine. L'estrazione con acetone-TCA, rispetto a tutti gli altri metodi provati, è quella che permette l'estrazione del maggior numero di proteine ed, anche se le immagini dei gel appaiono disturbate da strisciate verticali, la definizione degli *spot* appare molto buona.

In tutti gli esperimenti condotti in seguito a quest'analisi preliminare, gli 8 campioni di materiale vegetale (4 CNTRL e 4 HS) sono stati sottoposti simultaneamente ad estrazione adottando il protocollo con acetone-TCA.

## 3.2 Valutazione dei *range* di pH per l'IEF

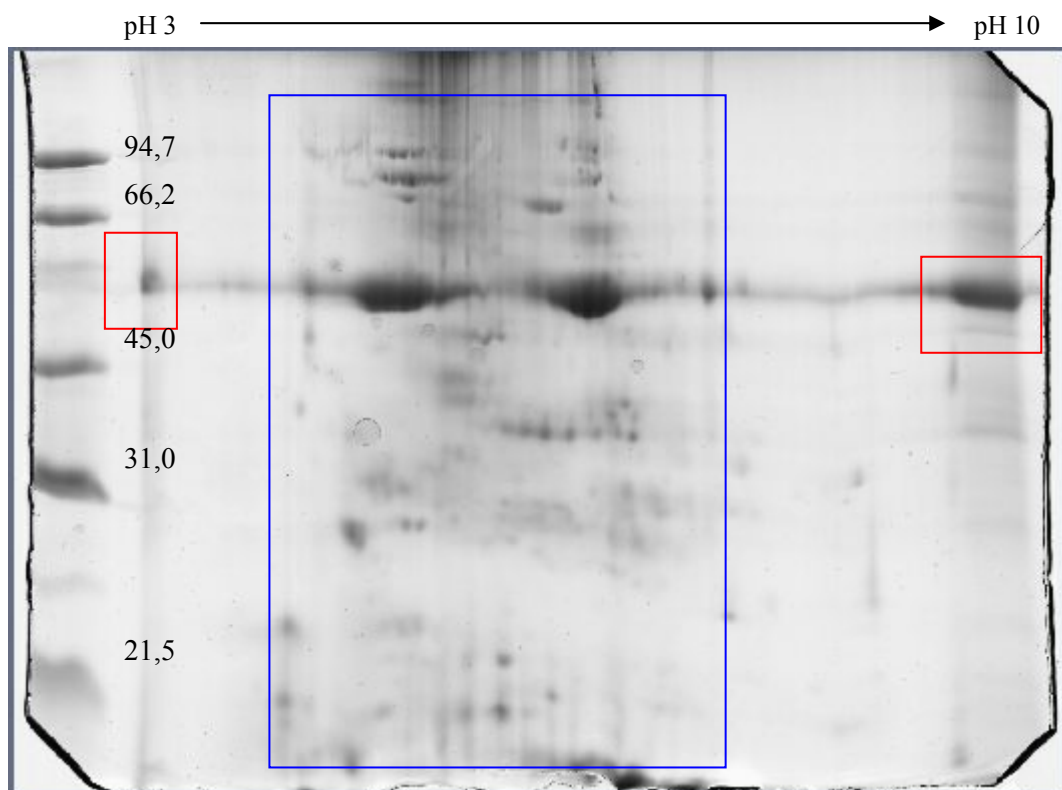
Per l'IEF è possibile utilizzare *gel strip* con diverso *range* di pH, in base alla composizione proteica dell'estratto, al punto isoelettrico delle proteine da separare ed al tipo di analisi da condurre successivamente. I *range* di pH possono essere larghi (7 unità di pH), medi (3 unità di pH) e stretti (1,2 unità di pH). Generalmente, si utilizzano *gel strip* a *range* largo quando si vuole avere un'ampia visione del pattern proteico. Può accadere che nei gel bidimensionali ottenuti con *gel strip* con *range* di

pH largo, si presentino zone in cui gli *spot* sono pochi o del tutto assenti. In questi casi, per aumentare la risoluzione degli *spot* proteici si utilizzano *gel strip* a *range* di pH inferiore. Quando si analizza una significativa zona del gel che comprende *spot* di interesse, si utilizzano *gel strip* con *range* medi e successivamente stretti. Quindi, minore è il *range* di pH e maggiore è la risoluzione degli *spot* che si vuole osservare ma, di conseguenza, la visione del pattern proteico totale diminuisce. Ma è possibile creare un gel virtuale *in silico*, utilizzando più gel con *range* di pH diversi sovrapponendo solo le zone di *range* di pH in comune. Il gel *in silico* permette quindi di avere una maggiore risoluzione e di avere una completa visione di tutto il pattern proteico. La disponibilità commerciale di *gel strip* a diverso gradiente di pH a crescita lineare permette di allestire precisi e riproducibili protocolli sperimentali nell'intento di separare le molecole di una qualsiasi miscela proteica.

### **3.2.1 Analisi bidimensionale con gel strip pH 3-10**

L'analisi bidimensionale preliminare delle proteine totali di erba medica (*Medicago sativa*) è stata condotta, utilizzando *gel strip* con *range* di pH 3-10. In figura 15 le macchie, nei rettangoli in rosso, corrispondono a proteine non focalizzate, perché durante la IEF si trovavano nella zona antistante gli elettrodi e quindi impossibilitate a migrare. Al fine di ottenere una migliore definizione della zona contenente il maggior numero di *spot* è stato necessario utilizzare *gel strip* con altri *range* di pH.

Infatti, come possibile notare nella figura, in entrambe le estremità del gel, gli *spot* sono pochi o assenti.

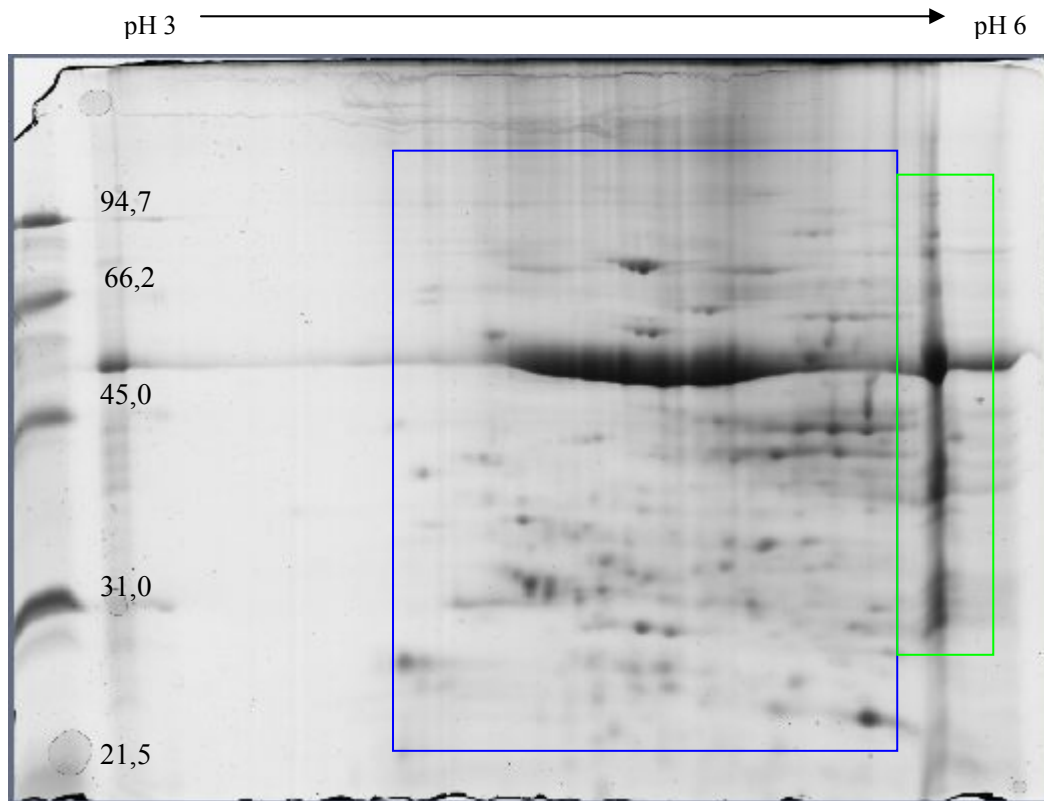


**Figura 15:** Gel bidimensionale di 450 µg di proteine estratte con acetone/TCA da erba medica (*Medicago sativa*) var. romagnola utilizzando *gel strip* con *range* di pH 3-10, gel di PAA al 12%. A sinistra si può osservare la corsa dello standard di peso molecolare (SDS page standard Low *range*, BIO-RAD cod 161-0304).

### 3.2.2 Analisi bidimensionale con *gel strip* pH 3-6

L'analisi bidimensionale è stata condotta successivamente utilizzando *gel strip* a *range* medio. Per meglio definire il limite più acido di punto isoelettrico delle proteine presenti in erba medica (*Medicago sativa*) sono stati utilizzati *gel strip* a *range* di pH 3-6. In figura 16 è possibile notare che all'estremità acida (pH 3-4) gli *spot* sono pochi o assenti e si concentrano soprattutto verso l'estremità meno acida, fino al limite di pH 6 (rettangolo verde). L'intensa strisciata verticale che coincide con il valore di pH 6 indica la presenza di proteine caratterizzate da un punto isoelettrico maggiore.

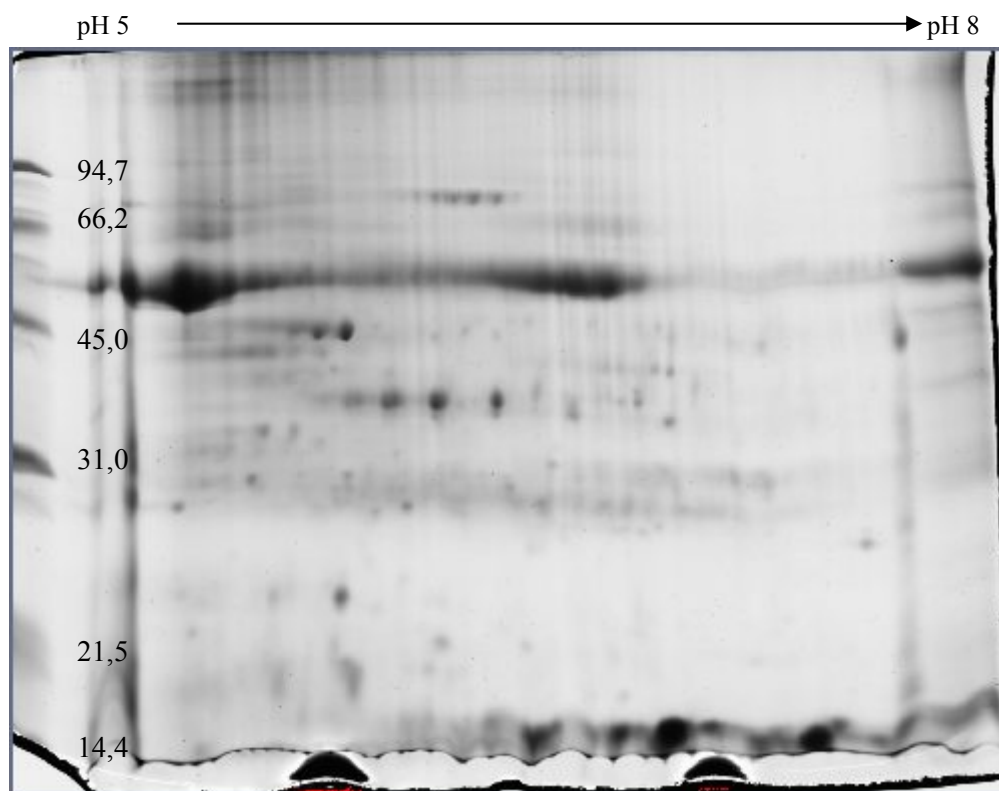
Gli esperimenti condotti hanno confermato che la maggior parte delle proteine estratte da erba medica (*Medicago sativa*) presentano un punto isoelettrico superiore al valore di pH 4.



**Figura 16:** gel bidimensionale di 200 µg di proteine estratte con acetone/TCA da erba medica (*Medicago sativa*) var. romagnola utilizzando *gel strip* con *range* di pH 3-6, gel di PAA al 12%. A sinistra si può osservare la corsa dello standard di peso molecolare (SDS page standard Low *range*, BIO-RAD cod 161-0304).

### 3.2.3 Analisi bidimensionale con gel strip pH 5-8

Già utilizzando *gel strip* a *range* di pH 3-10 era stato possibile dedurre che la maggior parte delle proteine totali estratte da erba medica (*Medicago sativa*) presenta un punto isoelettrico non superiore al valore di pH 8. Per meglio definire il limite più basilico di punto isoelettrico nel nostro campione proteico, sono stati utilizzati *gel strip* a *range* di pH 5-8. In figura 17 si osserva che tra pH 7.5 e pH 8 gli *spot* sono poco numerosi.



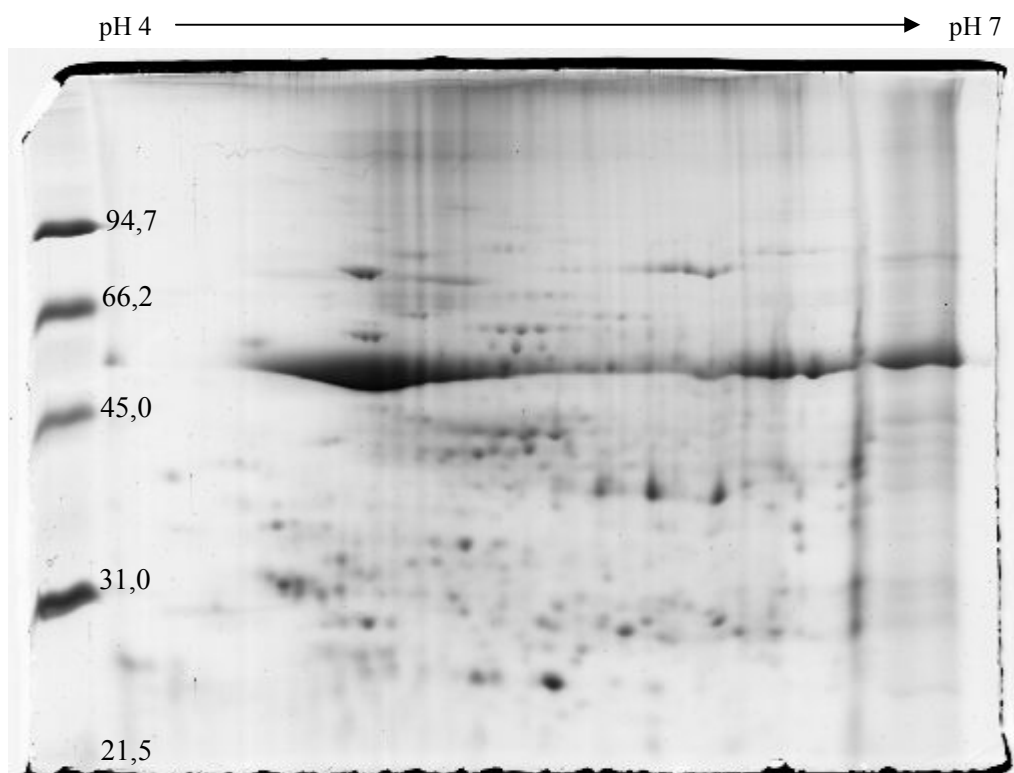
**Figura 17:** gel bidimensionale di 200 µg di proteine estratte con acetone/TCA da erba medica (*Medicago sativa*) var. romagnola utilizzando *gel strip* con *range* di pH 5-8, gel di PAA al 12%. A sinistra si può osservare la corsa dello standard di peso molecolare (SDS page standard Low *range*, BIO-RAD cod 161-0304).

### 3.2.4 Analisi bidimensionale con gel strip pH 4-7

Dopo queste analisi preliminari è stato possibile definire che le proteine negli estratti proteici di erba medica (*Medicago sativa*) sono caratterizzate da un punto isoelettrico nel *range* di pH 4.5–7.5. In commercio non sono disponibili *gel strip* con tale *range* di pH e, a meno che non si voglia preparare in laboratorio un *tube gel* o creare un gel virtuale in *silico*, il miglior compromesso è offerto da *gel strip* a *range* di pH 4-7. Come è possibile notare nella figura 18 gli *spot* sono molti e ben distribuiti su tutto il gel.



ReadyStrip Ipg Strips (BIO-RAD) a *range* di pH 4-7 sono state utilizzate in tutte le successive analisi.



**Figura 18:** gel bidimensionale di 200 µg di proteine estratte con acetone/TCA da erba medica (*Medicago sativa*) var. romagnola utilizzando *gel strip* con *range* di pH 4-7, gel di PAA al 10%. A sinistra si può osservare la corsa dello standard di peso molecolare (SDS page standard Low *range*, BIO-RAD cod 161-0304).

### 3.3 Analisi bidimensionale

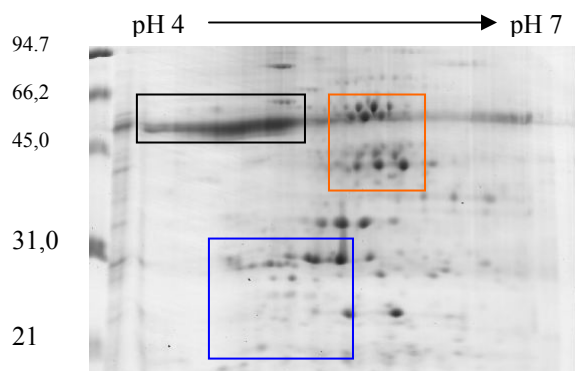
Una volta trovato il protocollo adatto per l'estrazione di proteine dalla matrice biologica d'interesse e il *range* di pH appropriato per la IEF, si può programmare un progetto di analisi bidimensionale. I fattori che devono essere presi in considerazione durante lo svolgimento del progetto sono la lunghezza del *gel strip* da utilizzare per la corsa ed il numero di repliche da fare. Generalmente, per lo studio di pattern proteici poco complessi, si utilizzano piccoli *gel strip* (7cm-11cm), nel caso in cui si debba studiare pattern proteici più complessi si utilizzano, invece, *gel strip* lunghi (11cm-24cm). Ogni campione è stato estratto e utilizzato in triplicato e per ogni replica sono state condotte tre indipendenti 2D-PAGE. Piccole variazioni durante la preparazione dei campioni e dei gel possono facilmente determinare differenze nella posizione e nell'intensità degli *spot* proteici. Le repliche dei gel consentono di valutare e stimare la variabilità tra i gel e consentire un'analisi statistica più corretta.

#### 3.3.1 Grandezza dei gel bidimensionali

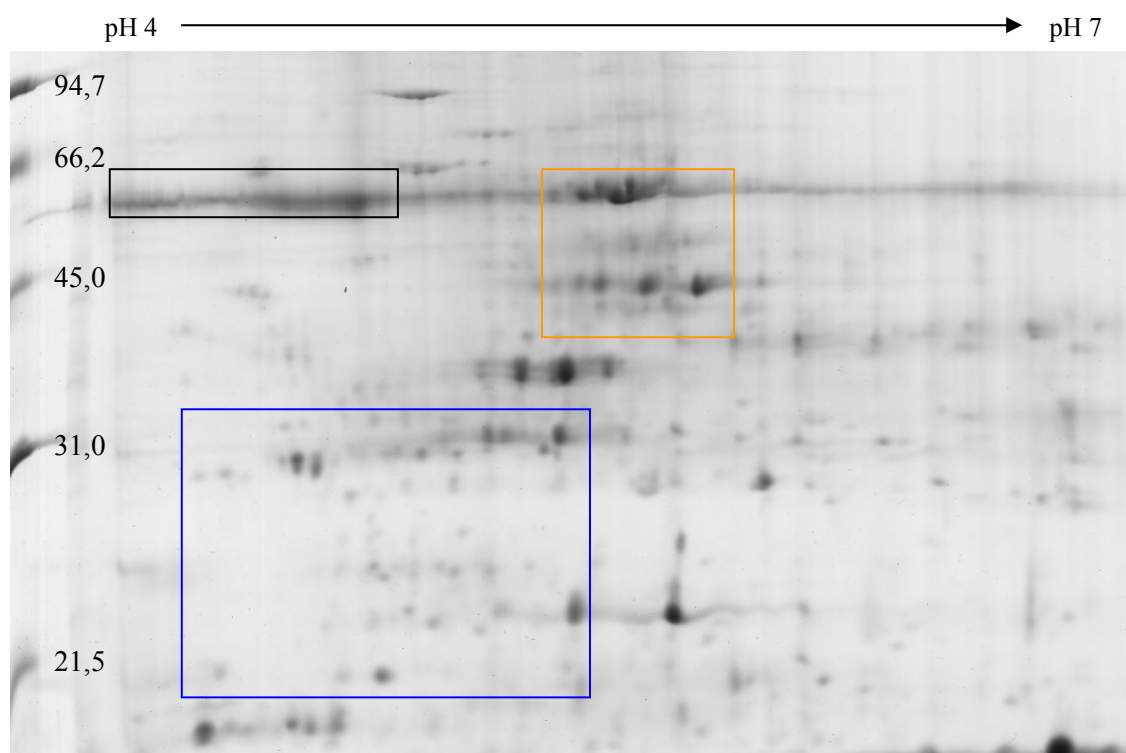
I gel da 7 cm, pratici e veloci da ottenere, si utilizzano, generalmente, nel corso delle attività inerenti la messa a punto di un protocollo di estrazione di proteine o per la scelta del *range* di pH più adatto dei *gel strip* da utilizzare. Una delle più grosse limitazioni legata all'uso di *gel strip* da 7 cm è la scarsa risoluzione degli *spot* nelle zone di maggiore concentrazione. Nei piccoli gel, infatti, gli *spot* corrispondenti alle diverse proteine sono spesso fisicamente troppo vicini e quindi difficili da identificare singolarmente: grossi *spot* sono più spesso dovuti alla presenza di più *spot* molto vicini che non ad un unico *spot*. Per poter avere una visione più completa del pattern proteico, in modo tale da poter analizzare il maggior numero di *spot* ottenibili da una miscela proteica, si utilizzano *gel strip* più grandi. Nel corso delle attività sperimentali inerenti questo lavoro di tesi, le analisi bidimensionali sono state condotte utilizzando *gel strip* da 17 cm.

Le figure 13 e 14 mostrano gel bidimensionali di alcuni campioni separati con *gel strip* di 7 cm e di 17 cm. In figura 14 si nota la riduzione dell'intensa striscia orizzontale situata a 50 KDa e l'incremento del numero di *spot* proteici ( ad esempio nelle zone comprese all'interno dei rettangoli). Complessivamente si osserva una migliore risoluzione dei gel grandi rispetto ai piccoli, tuttavia però alcuni *spot* risultano più distinti nei piccoli che nei grandi gel (55 KDa e pH 5.5). Questi risultati inattesi potrebbero essere dovuti ai diversi protocolli utilizzati, per le due tipologie di *gel strip*. Un esperimento condotto con *gel strip* da 7 cm richiede un totale di 19 ore di cui 14 per la reidratazione, 3 ore per l'IEF e 2 ore e 15 minuti per la seconda dimensione; un esperimento condotto con *gel strip* da 17 cm richiede, invece , un totale di 36 ore di cui 24 ore per la reidratazione, 6 ore per l'IEF e 6 ore per la seconda dimensione. Per motivi organizzativi, pertanto, l'IEF di *gel strip* da 17 cm vengono condotte O.N. aggiungendo al programma di corsa una fase, a voltaggio costante e pari a 800 Volt, per mantenere la focalizzazione delle proteine fino all'intervento dell'operatore. Quindi, mentre per i gel piccoli l'intervallo di tempo tra prima e seconda dimensione è relativamente breve, per i gel grandi trascorrono circa 10 ore dal termine dell'IEF prima di procedere con la corsa elettroforetica.

L'uso di *gel strip* da 17 cm per l'analisi di estratti proteici da *Medicago sativa* ha permesso di identificare e caratterizzare anche proteine a basso livello d'espressione ed ha fornito la possibilità di tagliare singoli *spot* proteici da sottoporre a spettrometria di massa.



**Figura 19:** Gel bidimensionale di 200  $\mu$ g di proteine estratte con acetone e TCA da erba medica (*Medicago sativa*) var. classe CNTRL utilizzando *gel strip* con range di pH 4-7 di 7 cm, gel di PAA al 12%.



**Figura 20:** Gel bidimensionale di 1.5 mg di proteine estratte con acetone e TCA da erba medica (*Medicago sativa*) var. classe CNTRL utilizzando *gel strip* con range di pH 4-7 di 17 cm, gel di PAA al 12%.

### 3.3.2 Importanza delle repliche

Lo scopo del progetto di tesi è quello di individuare differenze tra gel di CNTRL e HS che derivino da: induzione, repressione o diversa modulazione di espressione di alcune proteine dopo il trattamento termico delle piantine. Tuttavia, ci sono diversi fattori che possono influire sul pattern degli *spot* proteici. La

preparazione del campione, la preparazione dei gel SDS-PAGE, le condizioni di corsa dei gel, sono tutti fattori che possono determinare differenze significative tra gel bidimensionali.

Come si può notare dai dati riportati in tabella, paradossalmente, si riscontrano più differenze nell'intensità di alcuni *spot* tra gel su cui è stata separata la stessa miscela proteica (ad esempio CNTRL1.1-CNTRL1.3) che non tra estratti proteici diversi.

Questo fenomeno può essere spiegato supponendo errori nella manipolazione del campione durante la preparazione delle repliche.

E' per questa ragione che, nel corso delle attività sperimentali, è stata data grande importanza al numero delle repliche. Infatti, se l'analisi statistica è condotta su un numero elevato di repliche, è possibile attenuare quella variabilità tra gel, legata solo ad errori sperimentali.

Le estrazioni proteiche, dai 4 campioni vegetali CNTRL e 4 dai campioni HS, sono state condotte simultaneamente; per ogni estratto proteico (un campione CNTRL ed uno HS sono stati lasciati per riserva) sono state effettuate tre analisi bidimensionali; per la reidratazione dei *gel strip* è stata preparata un'unica miscela per ogni singolo campione; le corse bidimensionali sono state condotte parallelamente per tutti i campioni CNTRL (9 gel 2D) e per tutti i campioni HS (9 gel 2D).

Analysis Set	Type	Method	Count
CNTRL1.1 vs CNTRL1.3	Quant	Outside limits	17
CNTRL1.1 vs CNTRL2.1	Quant	Outside limits	18
CNTRL1.1 vs CNTRL2.3	Quant	Outside limits	16
HS1.3 vs HS2.1	Quant	Outside limits	15
HS1.3 vs HS3.1	Quant	Outside limits	11
HS1.3 vs HS3.3	Quant	Outside limits	10
CNTRL1.1 vs HS1.3	Quant	Outside limits	12
CNTRL1.1 vs HS2.1	Quant	Outside limits	11
CNTRL1.1 vs HS3.1	Quant	Outside limits	10
CNTRL1.1 vs HS3.3	Quant	Outside limits	10

**Tabella 5:** Differenze trovate tra le repliche dei gel, utilizzando il tipo di analisi quantitativo e il metodo *Outside limits*. Quest'analisi permette di confrontare e rilevare gli *spot* con intensità tre volte (3x) superiore o inferiore, tra due gel messi a confronto. Le repliche dei gel dei campioni controllo (CNTRL) e trattati (HS) sono state messe a confronto tra loro. Ad esempio dal confronto di CNTRL 1.1 con CNTRL 1.3, sono stati rilevati 17 *spot*. Su questi due gel (rep1 e rep3) è stata separata la stessa miscela proteica ottenuta dalla stessa estrazione(CNTRL1).

### 3.4 Analisi informatiche con PDQuest 2-D analysis Software (BIO-RAD, versione 7.2).

Al fine di stabilire le differenze tra i pattern proteici dei campioni HS e CNTRL è stato necessario condurre una serie di analisi qualitative, quantitative ed anche combinate tra loro. In queste analisi, ogni singolo *spot* proteico viene identificato, quantificato e sovrapposto allo *spot* equivalente trovato in tutti i gel. Al termine dell'analisi di tutte le repliche, è stato ottenuto un gel rappresentativo dei campioni CNTRL e di quelli HS, questo gel viene definito *replica group*.

La sovrapposizione del *replica group* CNTRL a quello HS, potrebbe portare all'identificazione di *spot* esclusivi del pattern proteico di uno o dell'altro campione.

Tuttavia, le modificazioni proteomiche più probabili consistono in alterazioni del livello di espressione di talune proteine. In questo caso è necessario comparare la quantificazione di *spot* equivalenti nei differenti gel. Le comparazioni vengono condotte impostando un programma di analisi in grado di misurare differenze quantitative tra i valori calcolati. La validità di queste differenze può anche essere valutata con metodi statistici se il numero delle repliche sperimentali è sufficientemente elevato.

### 3.4.1 Risultati per ogni analisi (*Analysis set report*)

Due dei nove gel bidimensionali, condotti per il campione CNTRL, non sono stati sottoposti ad analisi informatica a causa di una cattiva focalizzazione degli *spot* proteici. Gli *spot* significativi, identificati sulla base dei parametri di dimensione e di intensità, sono risultati essere pari a 193. In altri studi, riportati in letteratura, partendo da *gel strip* da 18 cm, sono stati identificati 512 *spot* proteici in *Medicago truncatula*, pianta leguminosa modello, (Watson *et al.*, 2003) e 523 in *Medicago sativa* (Incamps *et al.*, 2005). Il lavoro di questa tesi ha portato all'identificazione di un numero di *spot* significativamente più basso e questo ha sicuramente avuto grossa influenza sull'esito dei risultati.

La tabella 6 riporta il numero di *spot* (*count*) ottenuto con ciascuna analisi condotta sia confrontando il *replica group* CNTRL con quello HS che combinando i risultati dei diversi metodi utilizzati. L'analisi qualitativa viene utilizzata per rilevare *spot* esclusivi ed è stata effettuata secondo un parametro quantitativo per l'identificazione di *spot* 10 volte più intensi ( $i = \text{intensità} \geq 10X$ ) in un *replica group* rispetto all'altro. Le analisi quantitative, i cui risultati sono riportati nella seconda, terza e quarta riga della tabella, sono state utilizzate, successivamente, per le analisi di *boolean* (dalla quinta alla settima riga della tabella) che indicano il numero di *spot* quantitativamente differenti a diversi intervalli d'intensità. L'applicazione dello *Students' t-test* (95% di significatività) ha portato all'identificazione di 44 *spot* proteici statisticamente significativi (25% del totale) differenti tra CNTRL ed HS.

Combinando l'applicazione dello *Students's t-test* con le analisi qualitative e quelle quantitative, sono stati ottenuti i risultati riportati nelle ultime quattro righe della tabella. Forti differenze in quantità ( $i \geq 3X$ ) sono state trovate in 14 *spot* (7% del totale degli *spot*). Queste differenze consistono per lo più in *spot* proteici presenti nel CNTRL e non nell'HS e potrebbero essere spiegate ammettendo una degradazione di proteine in conseguenza del trattamento termico. In letteratura, studi condotti su pattern proteici di *Medicago sativa* (Incamps *et al.*, 2005), hanno portato a correlare

la bassa stabilità termica dell'enzima RuBisCO *activase* ( $T_d$  50 dopo 5 minuti a 33°C, studiata in spinacio da Crafts and Brander *et al.*, 1997 e Eckart and Portis, 1997), all'assenza dello *spot* corrispondente sui gel bidimensionali ottenuti da estratti proteici di tessuti sottoposti a stress. In conseguenza ad uno shock termico ci si aspetterebbe una riduzione di trascrizione di alcune proteine coinvolte in cicli metabolici di sviluppo della cellula per dare priorità alla sintesi di proteine, quali l'ubiquitina o l'HSP70 (Ortiz *et al.* 2001), con specifiche funzioni di "riparazione" dei danni causati dallo shock o di "induzione alla tolleranza". Studi condotti su *Medicago sativa* hanno dimostrato che una sHSPs, l'HS2C, si accumula solo in risposta a stress di calore (Waters *et al.*, 1996) mentre è del tutto assente nei tessuti fogliari in condizioni normali (Boston, 1996).

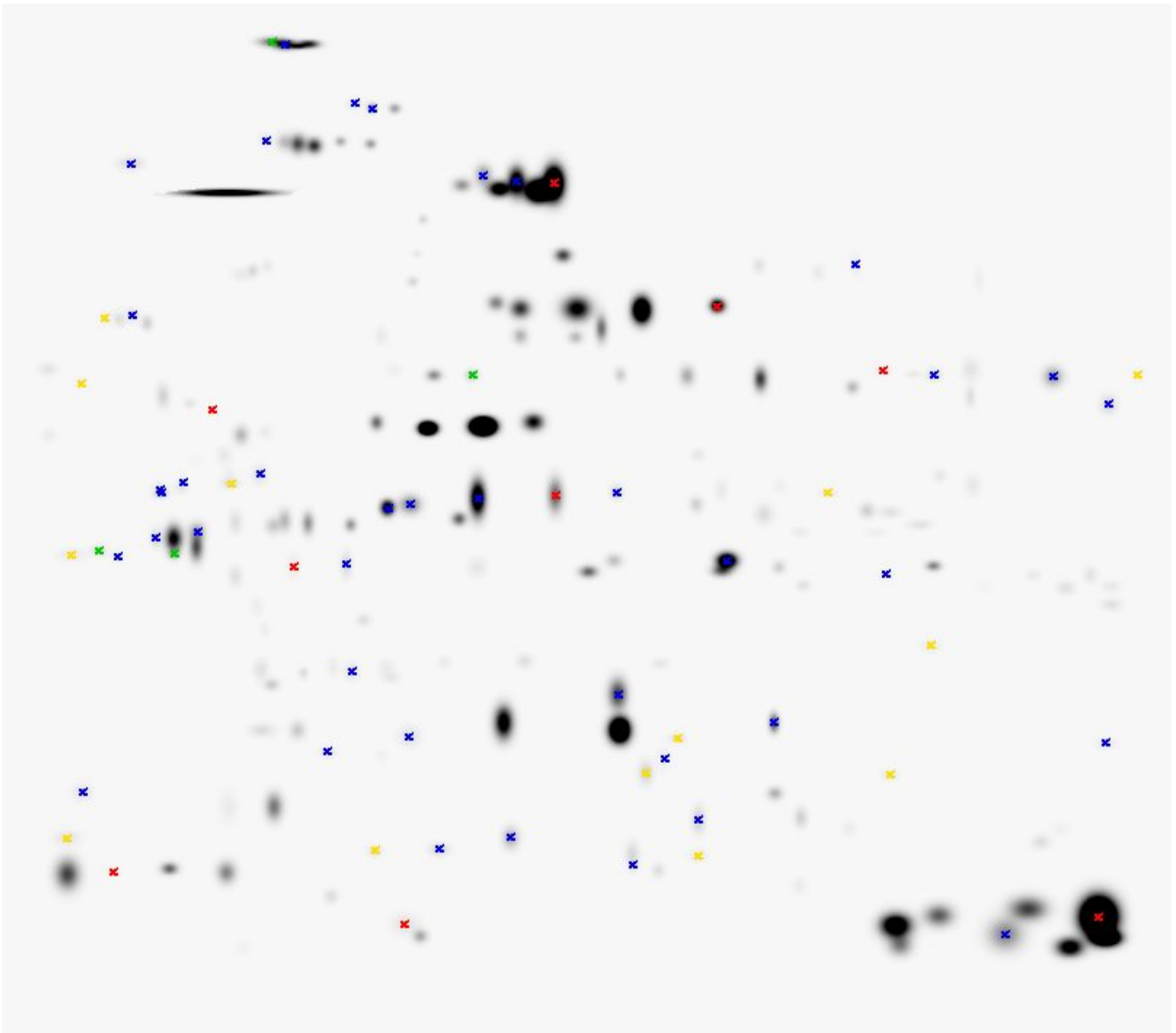
Differenze in espressione inferiori di tre volte tra CNTRL ed HS (undicesima e dodicesima riga in tabella), potrebbero anch'esse essere spiegate con fenomeni di degradazione o induzione di proteine anche se diventa sicuramente più difficile speculare sul significato di variazioni così piccole.

Purtroppo, come è possibile osservare nella figura 23, non è stata trovata nessuna correlazione tra peso molecolare (seconda dimensione) o pI (prima dimensione) e l'induzione o la degradazione di proteine.

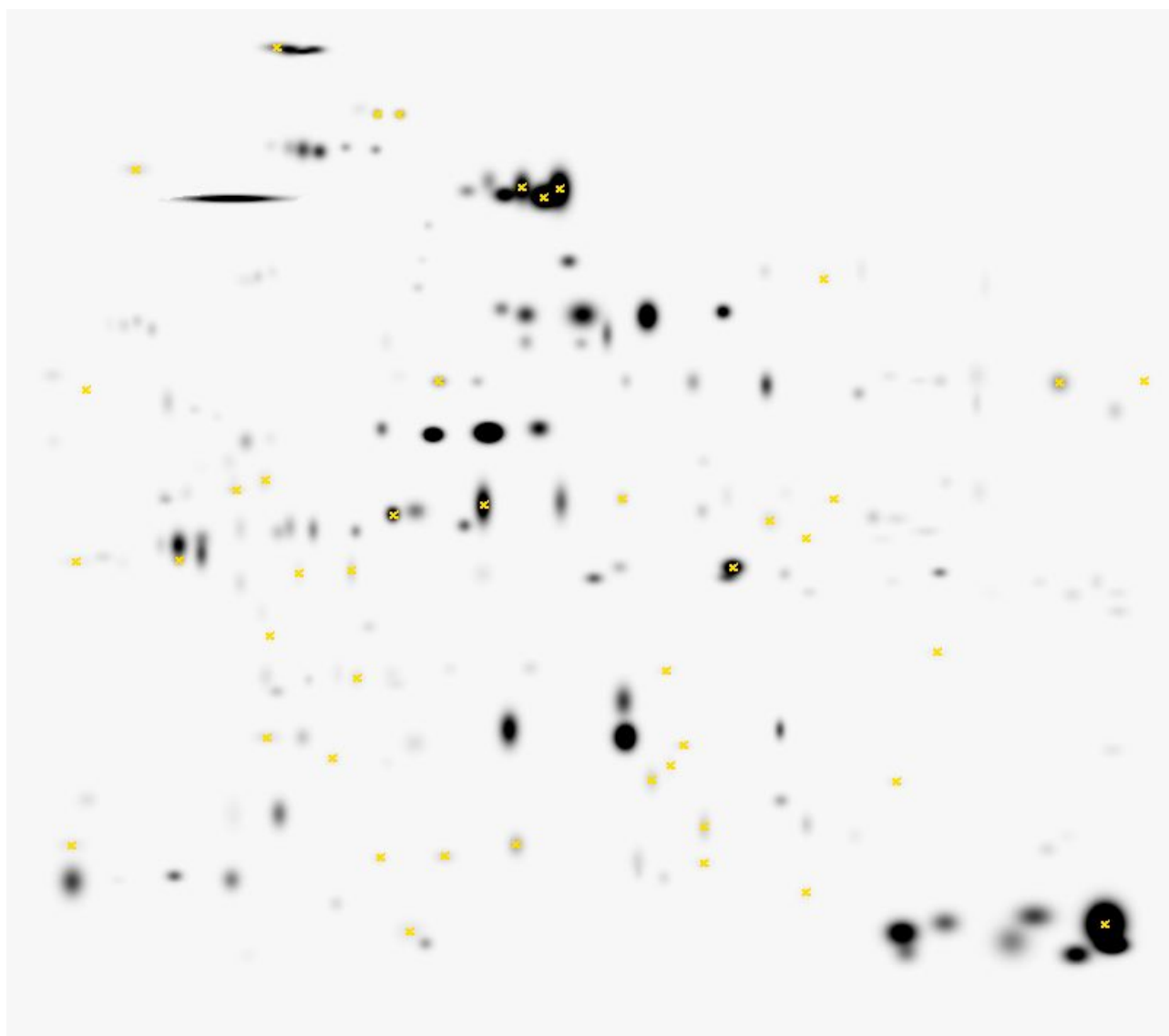


<b>Analysis Set</b>	<b>Type</b>	<b>Count</b>	<b>Method</b>	<b>Operand A</b>	<b>Operand B</b>
<i>Qualitative</i> ( $i \geq 10X$ )	<i>Quant</i>	13 (9:4)	<i>Outside limits</i>	CNTRL	HS
$i \geq 3X$	<i>Quant</i>	17	<i>Outside limits</i>	CNTRL	HS
$i \geq 2X$	<i>Quant</i>	26	<i>Outside limits</i>	CNTRL	HS
$i \geq 1.5X$	<i>Quant</i>	65	<i>Outside limits</i>	CNTRL	HS
$3X \leq i < 10X$	<i>Booln</i>	4 (1:3)	<i>In A but not B</i>	$i \geq 3X$	<i>Qualitative</i>
$2X \leq i < 3X$	<i>Booln</i>	9 (4:5)	<i>Not in A but in B</i>	$i \geq 3X$	$i \geq 2X$
$1.5X \leq i < 2X$	<i>Booln</i>	39 (23:16)	<i>In A but not B</i>	$i \geq 1.5X$	$i \geq 2X$
<i>Students t-test 95%</i>	<i>Stati</i>	44	<i>Student's t-test</i>	CNTRL	HS
<i>Student t-test and Qualitative</i>	<i>Booln</i>	12 (9:3)	<i>Intersection</i>	<i>Qualitative</i>	<i>Students t-test 95%</i>
<i>Student t-test and</i> $3X \leq i < 10X$	<i>Booln</i>	2 (0:2)	<i>Intersection</i>	$3X \leq i < 10X$	<i>Students t-test 95%</i>
<i>Student t-test and</i> $2X \leq i < 3X$	<i>Booln</i>	4 (1:3)	<i>Intersection</i>	$2X \leq i < 3X$	<i>Students t-test 95%</i>
<i>Student t-test and</i> $1.5X \leq i < 2X$	<i>Booln</i>	16 (10:6)	<i>Intersection</i>	$1.5X \leq i < 2X$	<i>Students t-test 95%</i>

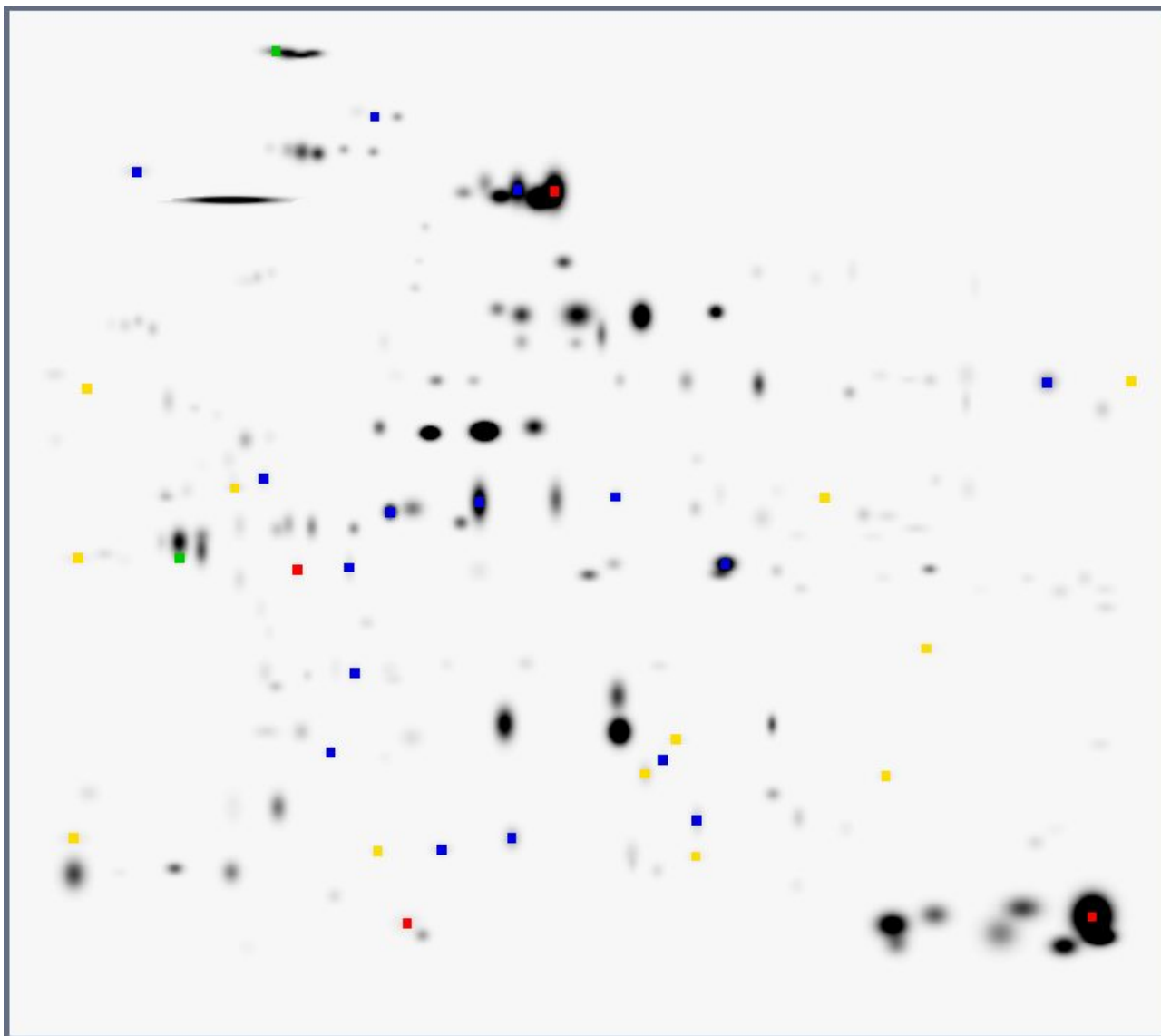
**Tabella 6:** Sono riportati i risultati ottenuti dall'Analisi Set sui replica group; *Type* indica il tipo di analisi discusso nei materiali e metodi (par. 2.10), *Method* indica le operazioni adottate da ogni tipo di analisi, *Operand A* e *B* indicano i gruppi da confrontare, *Count* indica il numero di *spot* ottenuti con ogni tipo e metodo di analisi utilizzato.



**Figura 21:** L'immagine mostra il *Master gel*; i diversi colori indicano la posizione degli *spot* rilevati con i metodi *quantitative* e *qualitative*: in verde sono rappresentati i 4 *spot* con intensità  $3X \leq i < 10X$ , in rosso i 9 *spot* con intensità  $2X \leq i < 3X$  ed in blu i 39 *spot* con intensità  $1.5X \leq i < 2X$ .



**Figura 22:** L'immagine mostra il *Master gel*; il colore giallo indica la posizione dei 44 *spot* rilevati dai replica group con il metodo Students t-test.



**Figure 23:** L'immagine mostra il *Master gel*; i diversi colori indicano la posizione degli *spot* rilevati con la combinazione dei metodi Students t-test, quantitativa e qualitativa nel confronto dei replica group: in verde sono rappresentati i 2 *spot* con intensità  $3X \leq i < 10X$ , in rosso i 4 *spot* con intensità  $2X \leq i < 3X$ , in blu i 16 *spot* con intensità  $1.5X \leq i < 2X$  e in giallo qualitativa con 12 *spot*.

### 3.4.2 Risultati quantitativi (*Quantity table report*) ed analisi di spettrometria di massa.

I 44 *spot* proteici differenti tra CNTRL ed HS, valutati statisticamente significativi, sono riportati nella tabella 7 con il numero SSP assegnato dal *software* nell'elaborazione dei dati. Accanto ad ogni *spot* sono riportati i valori di peso molecolare e punto isoelettrico, il volume, quindi la quantità, ed i valori del coefficiente di variazione (CV). La maggior parte degli *spot* in tabella ha un CV più alto del 20% mentre solo l'8% presenta un valore più basso (facendo invece

riferimento ai 193 *spot* identificati dal *software*, il 5% presenta un CV inferiore al 20%). Questo dato compromette l'attendibilità dei risultati, infatti, normalmente, una percentuale più alta degli *spot* che presentano un CV inferiore al 20% conferisce maggiore affidabilità ai risultati finali. Questo dato può essere dovuto ad un rumore di fondo troppo alto nei gel 2D ed ad una non corrispondenza in quantità proteica caricata sui *gel strip* nelle repliche di ogni campione, nonostante l'accurata programmazione dell'esperimento. In realtà, è probabile che, sui *gel strip* da 17 cm, sia stato caricato un quantitativo proteico inferiore a quello calcolato (1,5 mg).

Questo spiegherebbe anche perché il numero di *spot* sui gel 2D da 17 cm è risultato inferiore a quello evidenziato, nelle analisi preliminari, sui gel 2D da 7 cm.

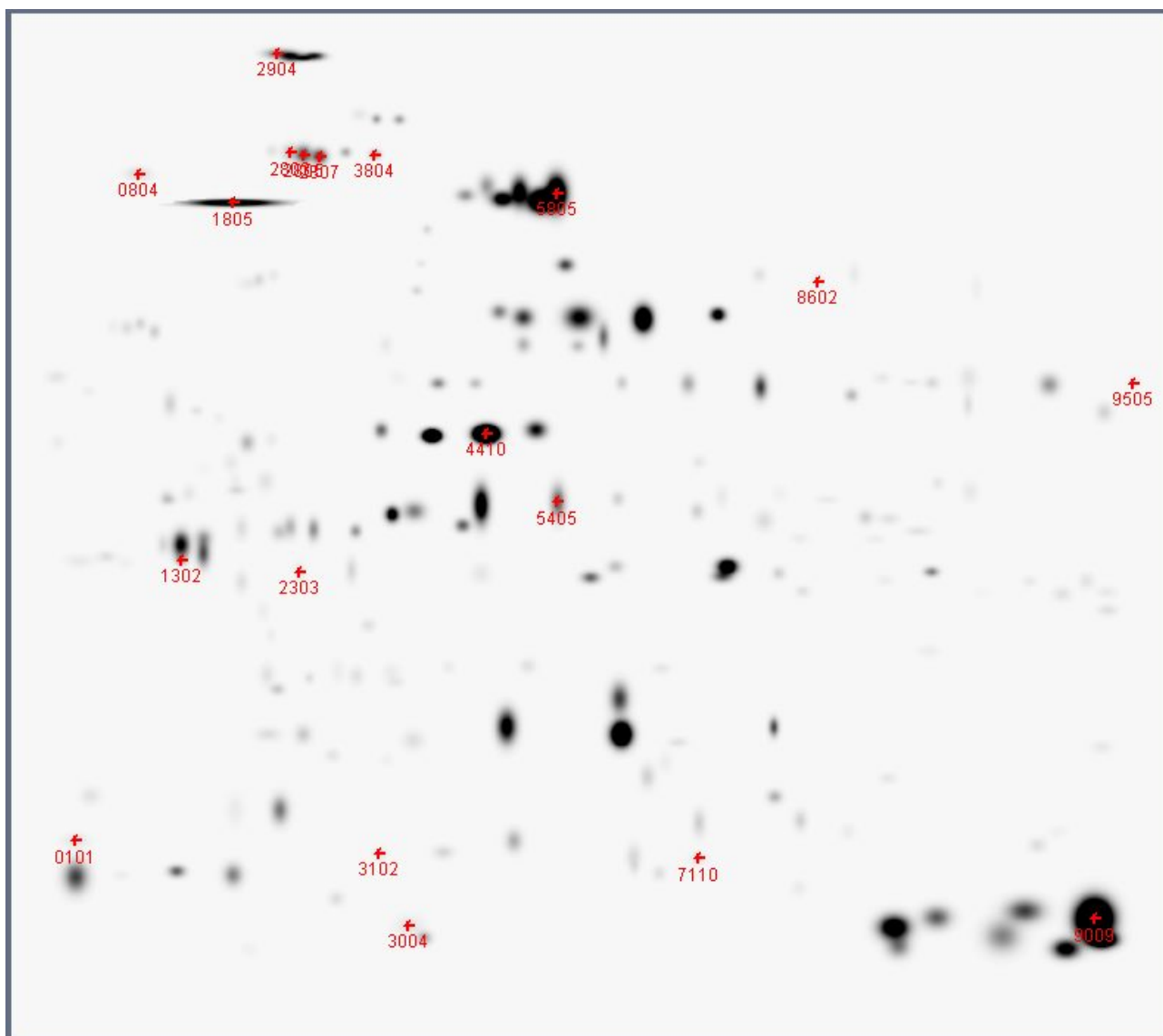
Infatti mentre i *gel strip* da 7 cm sono stati reidratati dopo l'estrazione ed il calcolo della concentrazione, la reidratazione dei *gel strip* da 17 cm è stata effettuata dopo qualche settimana. Durante il periodo di conservazione a -20°C, alcune proteine potrebbero essere precipitate variando il contenuto proteico totale ed alterando l'omogeneità del campione, influenzando, così, negativamente anche sulla riproducibilità delle repliche. Nell'elaborazione delle immagini dei gel 2D da 17 cm, il *software* PDQuest (BIO-RAD, versione 7.2), non è riuscito a rilevare molti *spot* proprio perché presenti in quantità troppo bassa e quindi colorati poco intensamente e facilmente confondibili con il rumore di fondo. Il *master gel* ottenuto, mostra, pertanto, un totale di soli 193 *spot*.

Nonostante la bassa quantità proteica, è stato comunque fatto il tentativo di identificare alcuni *spot* tra quelli risultati significativamente differenti tra CNTRL ed HS scegliendo quelli la cui quantità potesse essere sufficiente per le analisi. La selezione degli *spot* si è basata anche sulla posizione nel gel bidimensionale cercando *spot* a differenti Mr e pI. Gli *spot* selezionati, mostrati in fig. 24 sono indicati in tabella dal simbolo di #. Tra gli *spot* sono stati inseriti anche quello relativo ad una subunità della RuBisCO (SSP 1805) ed uno (SSP 4410) scelto solo perché tra i più intensi e ben definiti. Dei venti *spot* proteici selezionati e tagliati dai gel bidimensionali solo questi due ultimi *spot* si sono rivelati essere in quantità

sufficiente per condurre le analisi di identificazione. Dai risultati ottenuti dal centro S.M.A.R.T., riportati in appendice, è stato possibile confermare che lo *spot* SSP 1805, scelto come controllo positivo dell'analisi, corrisponde, come previsto, all'enzima Ribulosio-1,5-bifosfato carbossilasi/ossigenasi (RuBisCO) e, più precisamente, alla catena grande. Per quanto concerne lo *spot* SSP 4410 i risultati sono stati meno precisi dal momento che sono state fornite tre possibilità d'identificazione. Due delle possibilità fanno riferimento ad ipotetiche proteine di *Oriza sativa*; l'altra ad una putativa proteina del *Gossypium hirsutum* simile alla papaina cisteina proteinasi.

SSP	Mr (kDa)	pI	CNTR (OD x area)	CV	HS (OD x area)	CV		
0101	19.7	4.2	4	31%	386	91%	****	#
0303	29.6	4.2	248	93%	5	25%	****	
0508	39.4	4.2	51	81%	5	25%	****	
0804	64.7	4.3	1874	54%	982	47%	*	#
1204	26.9	4.7	126	34%	22	216%		
1205	23.7	4.7	458	44%	80	183%		
1302	29.6	4.4	935	55%	4321	89%	***	#
1405	33.5	4.6	731	21%	269	93%	*	
1410	33.0	4.6	133	102%	5	25%	****	#
2102	23.1	4.8	982	31%	649	28%	*	
2207	25.6	4.9	981	41%	573	24%	*	
2303	29.2	4.7	257	41%	537	37%	**	
2310	29.3	4.9	604	36%	970	28%	*	
2904	91.2	4.7	128	237%	2203	78%	***	#
3004	15.4	5.0	689	50%	150	117%	**	#
3102	19.0	4.9	291	41%	5	25%	****	#
3404	31.6	5.0	5261	20%	9902	27%	*	#
3806	75.4	4.9	1390	23%	869	8%	*	
3809	75.3	5.0	1085	17%	709	46%		
4103	19.0	5.1	383	84%	96	115%	*	
4408	32.2	5.2	13323	12%	20822	26%	*	
4502	39.9	5.1	1218	36%	1580	9%		
5102	19.7	5.3	1254	25%	437	82%	*	
5802	61.9	5.3	8773	20%	14390	23%	*	
5804	60.5	5.4	18168	28%	26735	14%		
5805	61.6	5.4	12379	21%	31587	25%	**	
6402	32.5	5.6	1507	27%	896	19%	*	#
7003	17.2	6.0	230	45%	108	92%		
7101	22.5	5.6	4	31%	421	106%	****	
7103	22.9	5.7	447	51%	198	77%	*	
7104	20.7	5.8	3083	34%	1972	33%	*	
7109	23.5	5.7	270	39%	5	25%	****	
7110	18.7	5.8	333	102%	5	25%	****	#
7205	25.8	5.7	185	26%	63	102%		
7304	29.4	5.9	5838	41%	9904	37%	*	
7305	31.3	5.9	1426	17%	1074	13%		
7307	30.5	6.0	151	47%	51	128%		
8108	22.4	6.3	221	51%	5	25%	****	
8203	26.4	6.4	143	48%	5	25%	****	
8402	32.4	6.1	102	48%	5	25%	****	
8602	49.3	6.1	211	43%	40	163%		#
9009	15.7	6.8	48761	54%	115717	23%	**	#
9501	39.8	6.7	2209	54%	4316	24%	*	
9505	39.9	6.9	4	31%	177	46%	****	#

**Tabella 7:** Classificazione di 44 *spot* evidenziati con Students t-test, SSP indica il codice assegnato a ciascuno *spot*, Mr indica il peso molecolare sperimentale calcolato dal programma sulla base della migrazione in seconda dimensione, pI indica il punto isoelettrico sperimentale, CV indica il coefficiente di variazione. I valori riportati nelle colonne CNTRL e HS rappresentano il volume medio (OD x area) di ogni *spot* calcolato confrontando tutti i gel del replica group. Il colore verde indica che lo *spot* è più intenso nel HS che nel CNTRL mentre il contrario per il colore rosso e il bianco indica che lo *spot* ha  $i < 1.5X$  Il numero degli asterischi quantifica la differenza dell'intensità di ciascuno *spot*, dove \*\*\*\*= $i \geq 10X$ ; \*\*\*= $i \geq 3$ ; \*\*= $2X \leq i < 3X$ ; \*= $1.5X \leq i < 2X$ . Il simbolo # indica gli *spot* scelti per le analisi di spettrometria di massa.



**Figura 24:** l'immagine mostra il *master gel*, in rosso sono riportati gli *spot* sottoposti ad analisi di spettrometria di massa.



# Capitolo 4

## Conclusioni e futuri sviluppi

#### 4. CONCLUSIONI E FUTURI SVILUPPI

Le attività sperimentali inerenti questo progetto di tesi non sono state, purtroppo, supportate da molti riferimenti bibliografici. Pertanto, ogni fase del progetto ha richiesto la messa a punto di protocolli ottimali per il raggiungimento dell'obiettivo:

- È stato messo a punto un protocollo di estrazione proteica da *Medicago sativa*, successivamente applicato per la preparazione degli otto campioni identificati (quattro CNTRL e quattro HS).
- È stato identificato il *range* di pH dei *gel strip* più adatto per condurre analisi bidimensionali dei campioni in esame.
- Per ciascun campione sono state condotte analisi bidimensionali preliminari utilizzando *gel strip* da 7 cm.
- Considerando tre campioni CNTRL e tre HS, facendo tre repliche per ogni campione, sono state condotte analisi bidimensionali utilizzando *gel strip* da 17 cm.
- Le immagini dei gel 2D sono state sottoposte ad elaborazione utilizzando il *software* PDQuest (BIO-RAD, versione 7.2).
- Il confronto tra profili proteomici di piante CNTRL ed HS ha portato ad evidenziare un certo numero di molecole proteiche differenti e statisticamente significative tra i campioni.
- Gli *spot* proteici d'interesse sono stati tagliati dai 2D gel disidratati per essere sottoposti ad analisi di spettrometria di massa.

I risultati di questa tesi, come già detto, sono il frutto di un unico esperimento che, per insufficienza di tempo non è stato possibile ripetere. In un secondo esperimento sarebbe stata data sicuramente più importanza alla conservazione dell'estratto proteico ed alla sua perfetta omogeneità prima di procedere alla reidratazione dei *gel strip*. Infatti la quantità proteica utilizzata per ogni campione, probabilmente inferiore a quella calcolata, si è rivelata essere la principale ragione per cui i risultati ottenuti non sono ottimali. La quantità proteica degli *spot* selezionati non è stata sufficiente neanche per portare a termine le analisi di spettrometria di massa.

L'obiettivo a più lungo termine del **“PROGETTO HSP MEDICA”**, di cui questo lavoro di tesi fa parte, è l'identificazione e successiva purificazione di proteine con caratteristiche terapeutiche da *Medicago sativa*. In letteratura, poche pubblicazioni riportano l'induzione e l'identificazione di HSP in pianta e, la maggior parte, esamina soprattutto le sHSPs. Per quanto concerne gli approcci di proteomica in erba medica (*Medicago sativa*), solo due sono state le pubblicazioni di riferimento. Nell'articolo di Incamps A. e collaboratori, nel 2005, hanno studiato le variazioni proteomiche durante la lavorazione industriale dell'erba medica nella produzione di Pro-Xan (pellet proteico). Un altro studio a cui è stato fatto riferimento, è quello condotto su differenti tessuti di *Medicago truncatula*, pianta leguminosa modello (Watson B.S. *et al.*, 2003). Appare chiaro che la ricerca in questo campo è ancora nella sua fase iniziale ma, il presente lavoro di tesi, sebbene limitato da difficoltà tecniche, ha pienamente dimostrato la potenzialità dell'approccio proteomico per l'identificazione e la successiva purificazione di proteine nel sistema biologico in esame.

# Capitolo 5

## Bibliografia

## 5 BIBLIOGRAFIA

- ❖ Agashe VR, Hartl FU (2000) Roles of molecular chaperones in cytoplasmatic protein folding. *Seminars in Cell & Development Biology* 11: 15-25.
- ❖ Baldoni R, Giardini L, Parrini P (1982) Erba Medica (*Medicago sativa* L.). In: *Coltivazioni Erbacee* pp 823-829. (ed) Patron Editore
- ❖ Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
- ❖ Buchanan BB, Grussem W, Jones RL (2003). In: *Biochimica e biologia molecolare delle piante.* (ed) Zanichelli.
- ❖ Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004) Blue Silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for protome analysis. *Electrophoresis* 25: 1327-1333
- ❖ Caplan AJ, Cyr DM, Douglas MG (1993) Eukaryotic homologues of *Escherichia coli* dnaJ: a diverse protein family that functions with hsp70 stress protein. *Mol Biol Cell* 4: 555-563.
- ❖ Celis JE, Gromov P (1999) 2D protein electrophoresis: Can it be perfected? *Curr Opin Biotechnol.* 10:16-21
- ❖ Crafts-Brander SJ, Van De Loo FJ, Salvucci ME (1997) The two forms of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activase differ in sensitivity to elevated temperature. *Plant Physiol.* 114: 439-444.
- ❖ Eckardt NA, Portis AR, Jr., (1997) Heat denaturation profiles of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) and rubisco activase and the inability of rubisco activase to restore activity of heat-denatured rubisco. *Plant Physiol.* 113: 243-248.
- ❖ Ewalt KL, Hendrick JP, Houry WA, Hartl FU (1997) - In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* 90: 491-500.
- ❖ Forreiter C, Nover L (1998) Heat stress-induced proteins and the concept of molecular chaperones. *J. Biosci.* 23: 287–302.

- ❖ Frydman J (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Ann Rev Biochem* 70: 603-647.
- ❖ Goloubinoff P, Mogk A, Zvi APN, Tomoyasu T, Bukau B (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13732-13737.
- ❖ Hemmingsen SM, , Woolford C, Van der Vies SM (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333: 330-334.
- ❖ Hightower LE, Sadis SE, Takenada IM (1994) Interactions of vertebrate hsc70 and hsp70 with unfolded proteins and peptides. In : *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*: 179-207, Morimoto et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ❖ Imai J, Maruya M, Yashiroda H, Yahara I, Tanaka K (2003) The molecular chaperone HSP90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *EMBO J* 22: 3557-3567.
- ❖ Kim J, Nueda A, Meng YH, Dynan WS, Mivechi NF (1997) Analysis of the phosphorylation of human heat shock transcription factor-1 by MAP kinase family members. *J Cell Biochem* 67: 43-54.
- ❖ Krishna P, Gloor G (2001) The HSP90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* 6: 238-246.
- ❖ Klose J (1999) Genotypes and phenotypes. *Electrophoresis*. 20: 643-52
- ❖ Leung SM, Hightower LE (1997) Mammalian Hsc70 and Hsp70 proteins. In: *Guidebook to Molecular Chaperones and Protein folding Catalysts* pp 52-58, Gething MJ (ed) Oxford University Press, Sambrook and Tooze Imprint, Oxford.
- ❖ Morimoto RI (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. *Genes Develop* 12: 3788-3796.
- ❖ Morshauser RC, Wang H, Flynn GC, Zuiderweg ERP (1995) The peptide-binding domain of the chaperone protein hsc70 has an unusual secondary structure topology. *Biochemistry* 34: 6261-6266.

- ❖ Nicoll WS, Boshoff A, Ludewig MH, Hennessey F, Jung M, Blatch GL (2006) Approaches to the isolation and characterization of molecular chaperones. *Protein Expression and Purification* 46: 1-15
- ❖ Ortiz C, Cardemil L (2001) Heat-shock responses in two leguminous plants: a comparative study. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1711-1719.
- ❖ Pelham HRB (1982) A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* HSP 70 heat shock gene. *Cell* 30: 517-528.
- ❖ Queitsch C, Hong SW, Vierling E, Lindquist S (2000) Heat stress protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 479-492.
- ❖ Ranford CJ, Coates ARM, Henderson B (2000) Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Exp Rev Mol Med* 15: 1-17.
- ❖ Ranson NA, White HE, Saibil HR (1998) Chaperonins. *Biochem J* 333: 233-242
- ❖ Ritossa FM (1962) A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experimenta* 18: 571-573.
- ❖ Singer MA, Lindquist S (1998) Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol Cell* 1: 639-648.
- ❖ Tissieres A, Mitchell HK, Tracy U (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84: 389-398.
- ❖ Wang TF, Chang JH, Wang C (1993) Identification of the peptide binding domain of hsc70-18kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding. *J Biol Chem* 268: 26049-26051.
- ❖ Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *TRENDS Plant Science* 9: 244-252.
- ❖ Waters ER, Lee GJ, Vierling E (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Bot* 47: 325-338.

- ❖ Watson BS, Asirvatham VS, Wang L, Sumner LW (2003) Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*) Plant Physiology 131: 1104-1123.
- ❖ Wilkins MR, Sanchez JC, Williams KL, Hochstrasser DF (1996) Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. Electrophoresis 17(5):830-8
- ❖ Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser, DF, (1997) Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics. pp 243 (ed) Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- ❖ Young JC et al. (2001) HSP90: a specialized but essential protein-folding tool. J Cell Biol 154: 267-273.



# Capitolo 6

## Appendice

# 6 APPENDICE

## SSP 1805

### Q1SHI3 Q1SHI3\_MEDTR

Ribulose biphosphate carboxylase, large chain.

UniProtKB/TrEMBL : [3880](#)

Score	Z-score	Mw	pI	Hits	Coverage	Shift (Da)	Slope (ppm)
17.53	1189.73	52674	6.22	10	23%	0.061333	140

Exp	Theo	Delta	Dev	MC	CA M	MS O	PT M	Position		Sequence
Da	Da	Da	ppm	ppm				start	end	
2396.511	2396.165 586	0.35	144	-20	1	-	-	22	- 41	LTYYPDYETKDTDILAAFR
985.774	985.5788 84	0.20	198	-3	1	-	-	132	- 139	ALRLEDLR
1416.072	1415.825 65	0.25	174	-8	1	-	-	135	- 146	LEDLRIPVAYVK
1466.04	1465.754 606	0.29	195	13	-	-	-	147	- 159	TFQGPPHGIQVER
1503.136	1502.851 15	0.28	190	9	-	1/1	-	165	- 177	YGRPLLCTIKPK
910.64	910.4450 96	0.19	214	7	-	1/1	-	188	- 194	AVYECLR
1533.052	1532.756 582	0.30	193	13	1	1/1	-	216	- 227	DRFLFCAEAIYK
1187.869	1187.664 34	0.20	172	-18	-	-	-	286	- 295	DNGLLLHIHR
1116.802	1116.582 98	0.22	196	1	-	1/1	-	422	- 431	VALEACVQAR
1259.91	1259.658 978	0.25	199	11	1	-	-	440	- 450	EGNEIIREATK

1 mspqtetkat vgfkagvkdy rLTYYPDYE TKDTDILAAF Rvspqpgvpa  
51 eeagaavaae sstgtwttvw tdgltsldry kgrcyhiepv agesqfiay  
101 vtypdlfee gsvtnmftsi vgnvfgfkal rALRLEDLRI PVAYVKTFQG  
151 PPHGIQVERd klnkYGRPLL GCTIKPKlgl saknygrAVY ECLRggldft  
201 kddenvnsqp fmrwrDRFLF CAEAIYKqa etgeikghyl natagtcedm  
251 mkravfarel gvpivmhdyl tggftanttl ahycrDNGLL LHIHRamhav  
301 idrqknhgmh frvlakalrm

# SSP 4410

## 1) [Q5K4K8](#) Q5K4K8\_GOSHI [Up](#)

Putative papain-like cysteine proteinase.

UniProtKB/TrEMBL : [3635](#)

Score	Z-score	Mw	pI	Hits	Coverage	Shift (Da)	Slope (ppm)
2.27	43.52	41303	5.71	4	22%	-0.082667	103

Exp	Theo	Delta	Dev	M C	CAM	MSO	P T M	Position	Sequence
Da	Da	Da	ppm	ppm				start end	
2314.228	2314.0985 68	0.13	56	-10	-	-	-	129 - 148	DATEAPILPTDNL PQDFDWR
1345.612	1345.5542 38	0.06	43	1	-	-	-	233 - 243	EEDYPYTG TDR
3145.787	3145.5630 76	0.22	71	-5	1	1/2	1/1	277 - 305	NGPLAVAINAVFMQTYIGGVSCP YICSKR
2297.24	2297.0495 8	0.19	83	16	1	1/1	1/1	352 - 373	GRNICGVDSMVSTVAAVNTNSE

1    mey~~r~~nvfpif    vifsffivgv    ictetfsaeg    fevdplieqv    tdghegaepq  
51    lltaehhysl    f~~k~~krf~~k~~ksyg    sqkehdy~~r~~f~~k~~    ifqvn~~r~~raa    rhqnl~~d~~psat  
101    hgvtqfsdlt    pgef~~r~~kaylg    l~~r~~rl~~r~~lp~~k~~DA    TEAPILPTDN    LPQDFDWR~~e~~k  
151    gavtpv~~k~~nqg    scgscwsfst    tgaleganfl    atg~~k~~lvslse    qqlvdcdech  
201    dpeeagscds    gcngglmnsa    feytl~~k~~aggl    m~~r~~EEDYPYTG    TDRgtc~~k~~fdn  
251    t~~k~~vaa~~k~~vanf    svsl~~d~~edqi    aanl~~f~~~~k~~NGPL    AVAINAVFMQ    TYIGGVSCP Y  
301    I~~C~~SKRldhgv    llvgygsagy    apv~~r~~m~~k~~dkpy    wiik~~n~~swgen    wgengfy~~r~~ic  
351    rGRNICGVDS    MVSTVAAVNT    NSE

## 2) [Q8H8N8](#) Q8H8N8\_ORYSA

**Hypothetical protein OSJNBa0070N04.10.**

UniProtKB/TrEMBL : [39947](#)

Score	Z-score	Mw	pI	Hits	Coverage	Shift (Da)	Slope (ppm)
2.25	43.17	35685	5.89	4	21%	-0.24	143

Exp	Theo	Delta	Dev	M C	CA M	MS O	PT M	Position		Sequence
Da	Da	Da	ppm	ppm				start	end	
3145.787	3145.56242	0.2 2	71	5	1	3/3	0/1	91	- 118	VLKGVLCPNNNVAESLAC <b>SALMQDCLLR</b>
1328.679	1328.75723 8	- 0.0 8	-58	-20	-	-	-	173	- 183	EVIFPVDQLIR
1303.681	1303.70045	0.0 2	-14	26	-	-	-	269	- 279	KPLSFQNEVVK
1913.98	1913.94590 4	0.0 3	18	0	1	1/2	-	284	- 300	GTVKLVEGE <b>CTTFTICR</b>

```

1  mtryrwecll ahilkkriii addwensygk ikilfhefim edyddgkpif
51  mgvcdgqfiq lfkadgtpee fglatlayil wkrniliaar VLKGVLCPNN
101 NVAESLACSA LMQDCLLRRed vdhlsiltds gavhraisge pvsehgpnsd
151 eyallkflas kfktctstqg prEVIFPVDQ LIRemeestn vrdtlekvla
201 kfaphfggqp lfrlsqnsta ltspvlphka qeksyihvde nfklqayihi
251 tndlfplkvv lvfdsfekKP LSFQNEVVKl lprGTVKLVE GECTTFTICR
301 vsflgvcana mffsd

```

### 3) [Q10DZ6](#) Q10DZ6\_ORYSA [Up](#)

**Hypothetical protein.**

UniProtKB/TrEMBL : [39947](#)

Score	Z-score	Mw	pI	Hits	Coverage	Shift (Da)	Slope (ppm)
2.19	41.97	36597	5.89	4	21%	-0.24	143

Exp	Theo	Delta	Dev	M C	CAM	MSO	P T M	Position		Sequence
Da	Da	Da	ppm	ppm				start	end	
3145.787	3145.56242	0.22	71	5	1	3/3	0/1	91	- 118	VLKGVLC PNNNVAESLAC SALMQDCLLR
1328.679	1328.75723 8	- 0.08	-58	-20	-	-	-	173	- 183	EVIFPVDQLIR
1303.681	1303.70045	- 0.02	-14	26	-	-	-	278	- 288	KPLSFQNEV NK
1913.98	1913.94590 4	0.03	18	0	1	1/2	-	293	- 309	GTVKLVEGE CTTFTICR

```

1  mtryrwecll ahilkkriii addwensy gk ikilfhefim edyddgkpif
51  mgvcdgqfiq lfkadgtpee fglatlayil wkrniliaar VLKGVLC PNN
101 NVAESLACSA LMQDCLLRed vdhl siltds gavhraisge pvsehgpnsd
151 eyallkflas kfk tctstgq prEVIFPVDQ LIRemeestn vrdtlekvla
201 kfaphfggqp lfrlsqnssa kdiinslaal tspvlphkaq eksyihvden
251 fklqayihit ndlfplkvvl vdfsfe kKPL SFQNEV NKll prGTVKLVEG
301 ECTTFTICRv sflgvcanam ffsd

```

